UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICROPARTÍCULAS CONTENDO ÓLEO DE *Cymbopogon citratus* – DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

VANESSA WEISHEIMER

Orientadora: Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

PORTO ALEGRE
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICROPARTÍCULAS CONTENDO ÓLEO DE *Cymbopogon citratus* – DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

Dissertação apresentada por Vanessa Weisheimer
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

PORTO ALEGRE

2008

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 02 de setembro de 2008 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Edison Luis Santana Carvalho
Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröehlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

W427m Weisheimer, Vanessa

Micropartículas contendo óleo de cymbopogon citratus: desenvolvimento, validação de método analítico e preliminar de estabilidade / Vanessa Weisheimer – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xx, 97 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Bibliotecária responsável: Margarida Maria C. F. Ferreira-CRB10/480.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela orientação, incentivo e autonomia dados durante o desenvolvimento deste trabalho e, sobretudo, pelo exemplo profissional e pessoal de dedicação e sucesso.

À Profa Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres pela co-orientação na etapa tecnológica desenvolvida neste trabalho e pela preciosa troca de conhecimento.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo auxílio e transferência de conhecimento, em especial aos professores do LEPCQ, Prof. Dr. Martin Steppe, Profa Dr Cássia Virgínia Garcia, Prof. Dr. Tércio Oppe, Profa Dr Nadia Volpato e Profa Dr Célia Chaves.

Aos colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do LEPCQ: Cássia, Ana Rita, Fanny, Magda, Lauren, Juliana Roman, Juliana Sippel, Júlia, Patrícia, Andreas, Heloísa, Alini, Aline, Gabriela, Marcelo, Rúbia, pela amizade, pela troca de informações e ambiente de trabalho sincero e divertido.

Ao amigo e colega Clésio Soldatelli Paim, pelo carinho, apoio e ajuda na realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório REBLAS: Lorena, Leila e Rose, pelo empréstimo de materiais e pelas conversas amigáveis. .

Aos todos os colegas do laboratório 405, pelo empréstimo de materiais e pela troca de experiências.

À Renata P. Raffin pelo auxílio nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura e pela preciosa troca de informações.

A Leonardo Zanchetti Meneghini pelo auxílio nas análises de IV.

A Fernando dos Mares Guia Jr., que concedeu-me tranquilidade e tempo em momentos preciosos para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas Cláudio Rodrigues, Mônica Carvalho e Jacel de Almeida Correa pelo apoio e incentivo.

A minha grande amiga Cristiane De Bona da Silva, pela oportunidade de dar continuidade ao seus estudos, pela orientação, discussões e, principalmente, pela força e incentivo dados a este trabalho e à elaboração do artigo científico.

A todos amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos Evandro, Daniela e Eduardo, que são meu porto seguro, pela alegria, incentivo e amor.

Aos meus pais, Ilena Kleber e Celso Weisheimer, pelo apoio, confiança e amor dispensados e, sobretudo, por incentivarem seus filhos a buscar o crescimento profissional no estudo e o alicerce necessário para tal nos laços familiares.

Ao Diogo Miron, pelo apoio incondicional, por ceder o seu tempo para a conclusão deste trabalho e, principalmente, pelo amor, alegria, incentivo e paixão dedicados a mim durante toda a realização deste trabalho.

Sumário

1. Introdução 1

2. Objetivos 2

2.1. Objetivo geral 2

2.2. Objetivos específicos 2

3. Revisão 3

3.1. Óleo de *Cymbopogon citratus* 3

3.1.1. Atividade antimicrobiana do óleo de *C. citratus* 4

3.1.2. Quantificação do óleo de *C. citratus* 5

3.1.3. Estabilidade do óleo de *C. citratus* e do citral 6

3.2. Microencapsulação 7

4. Capítulo I – caracterização do padrão de citral e do óleo de *Cymbopogon citratus* 11

4.1. Introdução 11

4.2. Parte experimental 11

4.3. Caracterização do citral padrão e do óleo de *C. citratus* por CG-DIC.12

4.3.1. Resultados e discussão 13

4.4. Avaliação da atividade antifúngica do óleo de *C. citratus* 15

4.4.1. Resultados e discussão 17

4.5. Validação de método analítico por CLAE para a quantificação de neral e geranial presentes no óleo *C. citratus* 19

4.5.1. Condições cromatográficas 20

4.5.2. Desenvolvimento de método por CLAE-UV para quantificação do neral e geranial em amostra de óleo de *C. citratus* 21

4.5.3. Especificidade 24

4.5.3.1. Resultados e discussão 25

4.5.4. Linearidade 28

4.5.4.1. Resultados e discussão 29

4.5.5. Precisão 30

4.5.5.1. Resultados e discussão 32

4.5.6. Exatidão 33

4.5.6.1. Resultados e discussão 35

4.5.7. Robustez 35

4.5.7.1. Resultados e discussão 38
4.5.8. Comparação dos métodos CLAE-UV e CG-DIC.....41
4.6. Conclusões.....41
5. Capítulo II – Preparação das Micropartículas.....43
5.1. Introdução 43
5.2. Parte experimental.....43
5.3. Preparação das micropartículas 44
5.4. Caracterização das micropartículas 46
5.4.1. Teor de umidade e determinação do rendimento e inclusão do óleo nas micropartículas.....46
5.4.1.1. Resultados e discussão – caracterização das micropartículas 47
5.4.2. Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....50
5.4.2.1. Resultados e discussão - IV 50
5.4.3. Análise morfológica das micropartículas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). 53
5.4.3.1. Resultados e discussão - MEV 53
5.4.4. Validação de método analítico por CLAE-UV para determinação quantitativa de neral e geranial presentes nas micropartículas.....55
5.4.4.1. Especificidade 55
5.4.4.1.1. Resultados e discussão 56
5.4.4.2. Precisão 57
5.4.4.2.1. Resultados e discussão 58
5.4.4.3. Exatidão 59
5.4.4.3.1. Resultados e discussão 61
5.5. Conclusões.....61
6. Capítulo III – Formulações e estabilidade.....63
6.1. Introdução 63
6.2. Preparação das amostras 63
6.2.1. Emulsão não-iônica O/A (ENI) 63
6.2.2. Gel hidrofílico (GH).....64
6.3. Adequação de método analítico por CLAE para determinação de neral e geranial em micropartículas incorporadas em ENI e GH. 65
6.3.1. Especificidade ENIPR.....66
6.3.1.1. Resultados e discussão – especificidade ENIPR.....66
6.3.2. Precisão ENIPR 67
6.3.2.1. Resultados e discussão – precisão ENIPR 68

6.3.3. Exatidão ENIPR 69

6.3.3.1. Resultados e discussão – exatidão ENIPR 70

6.3.4. Discussão de parâmetros analíticos para quantificação de neral e geranial em ENIPR 70

6.3.5. Especificidade GHPR 73

6.3.5.1. Resultados e discussão – especificidade GHPR 73

6.3.6. Precisão GHPR 74

6.3.6.1. Resultados e discussão – precisão GHPR 74

6.3.7. Exatidão GHPR 75

6.3.7.1. Resultados e discussão – exatidão GHPR 75

6.3.8. Discussão de parâmetros analíticos para quantificação de neral e geranial em GHPR 76

6.4. Estabilidade preliminar das formulações 77

6.4.1. Avaliação das características visuais e pH das formulações submetidas ao estudo de estabilidade 78

6.4.1.1. Resultados e discussão – características visuais e pH 78

6.4.2. Avaliação dos teores de neral, geranial e citral no estudo de estabilidade forçada 80

6.4.2.1. Resultados e discussão – avaliação dos teores na estabilidade 81

6.5. Conclusões 84

7. Considerações finais 85

8. Referências 86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química do citral a) geranial e b) neral.....4

FIGURA 2. Cromatogramas obtidos por CG-DIC. a) citral padrão; b) óleo de *C. citratus*.....14

FIGURA 3. Cromatograma em 210 nm de solução contendo citral e geraniol em coluna C8. Fluxo de 1,0 mL/min; FM acetonitrila:água (1:1)..22

FIGURA 4. Cromatograma em 240 nm de solução contendo citral e geraniol em coluna C18. Fluxo de 1,0 mL/min; FM acetonitrila:água:metanol (5:4:1).....22

FIGURA 5. Cromatograma em 240 nm de solução contendo citral e geraniol em coluna C18, com fluxo de 1,2 mL/min e FM acetonitrila:água:metanol (5:4:1).....23

FIGURA 6. Espectros de absorção no UV dos isômeros do citral. Comprimento de absorção máximo do neral = 239 nm; geranial = 241 nm.....24

FIGURA 7. Cromatogramas para determinação da especificidade da MPV e espectro de absorção no UV do geraniol (200 – 250 nm). a) Geraniol (210 nm); b) citral padrão (neral e geranial) (240 nm).....25

FIGURA 8. Cromatogramas para determinação da especificidade da MPV, em 240 nm, e espectro de absorção no UV do mirceno (200 – 250 nm).....26

FIGURA 9. Avaliação da pureza dos picos do neral e geranial em amostras de óleo de *C. citratus*. a) Perfil de pureza do pico do neral; b) Perfil de pureza do pico do geranial.....27

Figura 10. Espectros de IV. a) Amostra MßCDOPR; b) Citral. 51

FIGURA 11. Comparação dos espectros de IV da ß-CD ("CD"), MßCDOPR ("Filtrado") e MßCDOSA ("Spray"). 52

Figura 12. Fotomicrografias das micropartículas de ß-CD (a), MßCDOPR (b) e MßCDOSA (c) em magnitude de 1000X e MßCDOSA (d) em magnitude de 2000X.....53

FIGURA 13. Especificidade do método por CLAE-UV (240 nm) para as micropartículas de b-CD contendo óleo de *C. citratus*. a) LSS: solução diluente; b) ß-CD: solução de ß-CD ; c) Amostra: solução das MbCDOPR; d) Padrão: solução de citral padrão. 56

FIGURA 14. Pureza dos picos do neral e geranial na amostra de MbCDOPR.....57

FIGURA 15. Cromatogramas sobrepostos da solução ENI (a) e da solução ENIPR (b). Pureza dos picos do neral e geranial. 67

FIGURA 16. Cromatogramas sobrepostos da MPV e ENIPR. a) Cromatograma do primeiro dia de precisão da MPV; b) cromatograma do primeiro dia de precisão da ENIPR.....71

FIGURA 17. Relação das massas de MßCDOPR pesadas no ensaio de exatidão do ENIPR e as áreas dos picos do neral e geranial em 240 nm.

Equações da reta e coeficiente de determinação do geranial (superior) e do neral (inferior). 72

FIGURA 18. Cromatogramas sobrepostos da solução GH (a) e da solução GHPR (b). Pureza dos picos do neral e geranial. 73

FIGURA 19. Relação das massas de MbCDOPR pesadas no ensaio de exatidão do GHPR e as áreas dos picos do neral e geranial em 240 nm. ..77

FIGURA 20. Resultados de estabilidade a 40 °C para as amostras MßCDOPR e MbCDOSA no T_{zero}, T_{47} e T_{110}.....82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultados da análise por CG-DIC do citral padrão e óleo de *C. citratus*.....14

TABELA 2. Diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e citral. 17

TABELA 3. Comparação dos resultados obtidos com os descritos por RAUBER (2001) e SILVA (2005) na avaliação da atividade antifúngica do óleo de *C. Citratus* frente a C. albicans ATCC 10231.....18

TABELA 4. Métodos de análise por CLAE para determinação de monoterpenos e citral, encontrados na literatura.....19

TABELA 5. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE para determinação de citral presente no óleo volátil de *C. citratus*.....20

Tabela 6. Preparação da curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE para MPV.....28

TABELA 7. Resultados das áreas dos picos do neral e geranial para diferentes concentrações destas substâncias no ensaio de linearidade - método por CLAE-UV para MPV. 29

TABELA 8. Resultados da análise da regressão linear do neral e geranial no ensaio da linearidade - método por CLAE-UV para MPV.....30

TABELA 9. Resultados do ensaio de precisão na determinação de neral e geranial em amostra de óleo de *C. citratus*. 32

TABELA 10. Preparação das soluções mãe (SM) para a realização da exatidão do método analítico por CLAE-UV através do ensaio de recuperação. 33

TABELA 11. Preparação das soluções para a realização da exatidão do método analítico por CLAE-UV, para MPV, através do ensaio de recuperação. 34

TABELA 12. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de neral e geranial por CLAE-UV para o óleo de *C. citratus*. 35

TABELA 13. Fatores e níveis estudados para a realização do ensaio de robustez por CLAE-UV para MPV.....36

TABELA 14. Desenho experimental de Plackett-Burman selecionado para verificação da robustez do método analítico por CLAE-UV para MPV. 37

TABELA 15. Resultados referentes às porcentagens de neral e geranial, obtidas em cada experimento, do ensaio de robustez para MPV. 38

TABELA 16. Resultados dos efeitos e do efeito porcentual relativo para os fatores em análise no estudo da robustez por CLAE-UV para MPV.....39

TABELA 17. Relação dos resultados extremos encontrados para os parâmetros cromatográficos no estudo de robustez da MPV.....40

Tabela 18. Comparativo entre os métodos de CLAE-UV e CG-DIC.....41

TABELA 19. Condições operacionais utilizadas na técnica de SA. 45

TABELA 20. Resultados obtidos na determinação do teor de umidade das micropartículas. 47

TABELA 21. Resultados obtidos para o rendimento das micropartículas.48

TABELA 22. Resultados obtidos para a inclusão do óleo nas micropartículas. 49

TABELA 23. Comparação dos espectros de IV da ß-CD ("CD") e amostras MßCDOPR e MßCDOSA. 52

TABELA 24. Resultados do ensaio de precisão na determinação de citral (neral e geranial) em amostra de Mb CDOPR*. 59

TABELA 25. Quantidades de citral padrão pesadas para o ensaio de exatidão. 60

TABELA 26. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de citral (neral e geranial) por CLAE-UV na amostra de Mb CDOPR*. 61

TABELA 27. Componentes empregados na preparação das ENIs. 64

Tabela 28. Componentes empregados na preparação dos GHs. 65

TABELA 29. Resultados do ensaio de precisão na determinação de citral (neral e geranial) em amostra de ENI*. 69

TABELA 30. Quantidades de MbCDOPR e ENI empregadas no ensaio de exatidão. 69

TABELA 31. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de citral (neral e geranial) por CLAE-UV na amostra de ENIPR*. 70

7Tabela 32. Resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema para amostra de MPV empregando a coluna ACE C18 (lote A35880) e para ENIPR empregando pré-coluna e coluna ACE C18 (lote A20966). 72

TABELA 33. Resultados do ensaio de precisão na determinação de citral (neral e geranial) em amostra de gel hidrofílico*. 75

TABELA 34. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de citral (neral e geranial) por CLAE-UV na amostra de GHPR*. 76

Tabela 35. Resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema para amostra de GHPR no primeiro dia de precisão. 76

TABELA 36. Características visuais e pH das formulações submetidas a temperatura de 40 ºC. 79

TABELA 37. Teores de citral (neral e geranial) nas amostras MbCDOPR e Mb CDOSA submetidas ao ensaio de estabilidade. 81

TABELA 38. Porcentagens de citral (neral e geranial) encontradas nas formulações após 110 dias de armazenagem a 40 °C. 82

LISTA DE ABREVIATURAS

ß-CD – Betaciclodextrina

BV – Balão Volumétrico

CG – Cromatografia a gás

CG-DIC – Cromatografia a Gás com Detector de Ionização de Chamas

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ENI – Emulsão Não-iônica

ENIPR – Emulsão Não-iônica contendo MßCDOPR

ENISA – Emulsão Não-iônica contendo MßCDOSA

FM – Fase Móvel

GH – Gel Hidrofílico

GHPR - Gel Hidrofílico contendo MßCDOPR

GHSA – Gel Hidrofílico contendo MßCDOSA

HP-ß-CD – Hidroxipropil-beta-ciclodextrina

LSS – Lauril Sulfato de Sódio

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MP – Matéria-prima

MPV – Matéria-prima Vegetal

MßCDOPR – Micropartículas contendo ß-CD + óleo preparadas pela técnica de Precipitação.

MßCDOSA – Micropartíulas contendo ß-CD + óleo preparadas pela técnica de Secagem por Aspersão.

MHPßCDOSA - Micropartíulas contendo HP-ß-CD + óleo preparadas pela técnica de Secagem por Aspersão.

PR – Precipitação

SA – Secagem por Aspersão

SE – Solução Estoque

SM – Solução Mãe

RESUMO

Considerando a atividade antifúngica demonstrada, o óleo de *Cymbopogon citratus* apresenta-se como uma promissora matéria-prima no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Para a utilização em formulações, é necessário que se verifique a qualidade do óleo, determinada pelo teor de citral, seu componente majoritário. Além disso, cuidados relacionados à sua estabilidade devem ser considerados. Na busca por método alternativo à técnica de cromatografia a gás, comumente utilizada para óleos voláteis, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar o citral presente no óleo de *C. citratus*, na forma de seus isômeros geométricos, o neral e o geranial. Em virtude da volatilidade e suscetibilidade à degradação apresentadas pelo óleo de *C. citratus*, foram preparadas micropartículas contendo essa substância, a fim de melhorar sua estabilidade. Foram avaliadas duas técnicas de preparação, a secagem por aspersão e a precipitação, além de dois materiais encapsulantes, a beta-ciclodextrina e a hidroxipropil-beta-ciclodextrina. As micropartículas preparadas foram caracterizadas em relação ao teor de umidade, rendimento, porcentagem de inclusão, espectrofotometria na região do infravermelho e a morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de varreduta. Para determinar os teores de neral e geranial presentes nas micropartículas, método por CLAE foi validado. As micropartículas foram incorporadas em emulsões não-iônicas e géis hidrofílicos e estas formulações foram avaliadas quanto às suas propriedades físico-químicas e em relação a sua estabilidade. Os teores de neral e gernanial foram determinados utilizando-se método por CLAE adapatado do método descrito para as micropartículas.

Palavras chave: óleo de *Cymbopogon citratus*, cromatografia liquida de alta eficiência, micropartículas, ciclodextrina, estabilidade.

ABSTRACT

Considering the antifungal activity demonstrated the oil of *Cymbopogon citratus* presents as a promising raw material for the development of pharmaceutical products. For use in pharmaceutical formulations, it is necessary to verify the quality of the oil, determined by the citral content, its major compound. Moreover, precautions related to its stability should be considered. In the search for alternative method to the technique of gas chromatography, commonly used for volatile oils, one of the purposes of this work was to develop and to validate analytical method by high performance liquid chromatography for quantitation of the citral contents in the *C. citratus* oil, as its geometric isomers, neral and geranial. Because of the volatility and susceptibility to degradation presented by *C. citratus* oil, microparticles containing this oil were prepared in order to improve its stability. Two techniques of preparations were evaluated; spray-drying and precipitation, and also two materials of encapsulation, beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin were tested. The microparticles were characterized by their content of water, yielding, percentage of inclusion, infrared spectroscopy (IV), and the morphology was evaluated by scanning electronic microscopy (SEM). For the determination of neral and geranial contents present into microparticles an HPLC method was validated. The microparticles were incorporated in nonionic emulsions (NIE) and hydrophilic gels (HG), and physico-chemical properties as well as stability of these formulations were evaluated. The neral and geranial contents were determined using the HPLC method adapted from that described for the microparticles.

Keywords: *Cymbopogon citratus* oil, high performance liquid chromatography, microparticles, cyclodextrin, stability.

1. INTRODUÇÃO

O óleo volátil de *Cymbopogon citratus* apresenta acentuada atividade antifúngica frente a diversas espécies de *Candida* e fungos dermatófitos. A atividade do óleo está ligada, principalmente, à presença de citral (mistura dos isômeros neral e geranial), seu componente majoritário, sendo o teor do mesmo um indicativo da qualidade do óleo. Em virtude da atividade apresentada pelo óleo de *C. citratus*, esta matéria-prima (MP) tem se mostrado promissora para ser incorporada em formulações farmacêuticas. Dessa forma, torna-se necessário realizar a caracterização desta matéria-prima, a fim de avaliar o teor de citral presente e garantir sua qualidade como produto farmacêutico.

Na literatura científica, o método comumente utilizado para caracterização de óleos voláteis é a Cromatografia a Gás (CG), contudo, existem estudos buscando uma metodologia alternativa a esta técnica. Alguns trabalhos descrevem a técnica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação do citral, mas poucas relacionam sua determinação em relação aos teores de neral e geranial, separadamente.

A utilização de compostos voláteis como MP determinam cuidados especiais em relação a sua estabilidade, uma vez que são suscetíveis a processos degradativos e facilmente volatilizados. A técnica de microencapsulação apresenta-se como alternativa para proteção de compostos voláteis, uma vez que possibilita a incorporação do composto em uma matriz que o protege frente a processos degradativos e diminui sua volatilidade.

O presente estudo objetivou contornar o problema da volatilização apresentada pelo óleo de *C. citratus* através da sua microencapsulação e, apostando no potencial desta matéria-prima, incorporar as micropartículas preparadas em formulações farmacêuticas. Esta proposta demonstra o ineditismo deste trabalho, uma vez que tais formulações não foram descritas na literatura, bem como os métodos para sua avaliação quantitativa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo óleo de *Cymbopogon citratus* e incorporação em formulações farmacêuticas.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização do óleo volátil de *C. citratus* por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC), para determinação do teor dos isômeros neral e geranial;
- Avaliar a atividade antifúngica apresentada pelo óleo volátil de *C. citratus* frente à *Candida albicans* ATCC 10231;
- Desenvolver e validar método analítico por (CLAE), para a determinação quantitativa de citral (neral e geranial) presente no óleo volátil de *C. citratus*;
- Realizar a microencapsulação do óleo volátil de *C. citratus,* utilizando as técnicas de secagem por aspersão (SA) e precipitação (PR);
- Realizar a caracterização das micropartículas contendo o óleo volátil;
- Avaliar preliminarmente a estabilidade das micropartículas;
- Realizar a quantificação do citral (neral e geranial) presente nas micropartículas, adaptando método por CLAE previamente validado;
- Incorporar as micropartículas em formulações farmacêuticas e avaliar sua estabilidade.

3. REVISÃO

3.1. Óleo de *Cymbopogon citratus*

O *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (*Poaceae)* é uma planta originária do Sudeste Asiático que ocorre espontaneamente em regiões tropicais e subtropicais (GUENTHER, 1950). É conhecido, popularmente, como capim-cidró, capim-limão, erva-cidreira, capim-cheiroso, capim-santo, capim-cidreira, entre outros (SIMÕES *et al.,* 1995; F. BRAS, 2003).

O *C. citratus* é utilizado na medicina popular como diurético, digestivo, emenagogo, antiinflamatório, antitussígeno e analgésico (SIMÕES *et al.,* 1995; F. BRAS, 2003).

As folhas do *C. citratus*, as quais apresentam coloração verde-pálida, são ricas em óleo volátil e possuem odor aromático agradável, característico de limão (F. BRAS, 2003). Este óleo é conhecido internacionalmente como *lemongrass* e possui grande valor comercial, sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia e cosmética, na obtenção do citral (GUENTHER, 1950; FERREIRA; FONTELES, 1989), além de apresentar atividades antimicrobiana e antioxidante (BARATTA *et al*., 1998; HAMMER *et al.*, 1999; SACCHETTI *et al.,* 2005), antiparasitária (KIM *et al*., 2004) e inseticida (RAJAPAKSE; VAN EMDEN, 1997; OYEDELE *et al.*, 2002;).

A composição química do óleo volátil varia de acordo com diversos fatores, como a diversidade genética, habitat, clima e tratamento agronômico da cultura (SIMÕES *et al.,* 1995; CARLSON *et al.*, 2001). O óleo de *C. citratus* é caracterizado pelo alto conteúdo de citral, e, além disso, é variavelmente constituído de pequenas quantidades de geraniol, geranilacetato, limoneno e mirceno (WEISS, 1998). O teor de citral presente no óleo varia em torno de 60 a 85% (RAUBER, 2001; F. BRAS, 2003; SILVA, 2005; PAVIANI *et al.*, 2006).

O componente majoritário do óleo volátil é o citral, que confere o odor característico de limão ao mesmo. O citral é constituído pela mistura de dois isômeros geométricos, o neral e o geranial (Figura 1) (GUENTHER, 1950; FERREIRA; FONTELES, 1989) e é utilizado como fragrância em cosméticos,

aromatizante em alimentos e na síntese de iononas e vitamina A (GUENTHER, 1950; FERREIRA; FONTELES, 1989; DÍEZ *et al.*, 2008), além de apresentar atividade antimicrobiana (KURITA *et al.*, 1981; ONAWUNMI *et al.*, 1984; ONAWUNMI, 1989; CHAUMONT; LÉGER, 1992; MAHMOUD, 1994; WANNISSORN *et al.*, 1996; WOLKEN *et al.*, 2002; PALHANO *et al.*, 2004) e inseticida (VARTAK *et al.*, 1994).

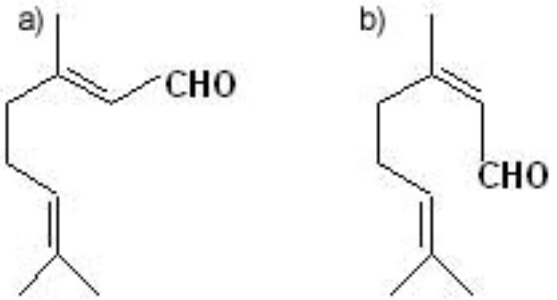


FIGURA 1. Estrutura química do citral - a) geranial e b) neral.
Fonte: INDEX MERCK, 2000.

3.1.1. Atividade antimicrobiana do óleo de *C. citratus*

Dentre as atividades apresentadas pelo óleo de *C. citratus*, a atividade antimicrobiana despertou o interesse de diversos autores, que realizaram pesquisas relacionadas à atividade antibacteriana e antifúngica apresentada pelo óleo e seu componente majoritário, o citral. O óleo apresentou atividade frente a diversos microrganismos, dentre os quais destacam-se os fungos dermatófitos (LIMA *et al.*, 1992; KISHORE *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 1993; WANNISSORN *et al.*, 1996; INOUYE *et al.*, 2001; INOUYE , 2003), *Escherichia coli* (ONAWUNMI *et al.*, 1984; OGUNLANA *et al.*, 1987; PATTANAIK *et al.*, 1995a ; BARATTA *et al.*, 1998; EL-KAMALI *et al.*, 1998; HAMMER *et al.*, 1999; SCHUCK *et al.*, 2001; CIMANGA *et al.*, 2002; WANISSORN *et al.*, 2005), *Candida albicans* (CARMO *et al.*, 1998; HAMMER *et al.*, 1999; SCHUCK *et al.*, 2001; ALZAMORA *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2003; SACCHETTI *et al.*, 2005) e não *albicans Candida spp* (SILVA *et al.*, 2008).

A utilização do óleo de *C. citratus* como agente antimicrobiano em alimentos tem sido reportada por diversos autores, que demonstram sua atividade no controle de patógenos e toxinas produzidas por microrganismos (MISHRA; DUBEY, 1994; REDDY *et al*., 1998; SOLIMAN; BADEAA, 2002; VALERO; SALMERON, 2003), sugerindo seu uso como aditivo natural em muitos alimentos (ADEGOKE; ODESOLA, 1995; TEISSEDRE; WATERHOUSE, 2000).

Alguns autores avaliaram o efeito inibitório do óleo de *C. citratus* e de seu componente majoritário, o citral, frente a microrganismos causadores de infecções fúngicas em plantas. Os resultados demonstraram que ambos apresentaram atividade, relacionando a importância deste componente na ação antifúngica do óleo (MAHMOUND, 1994; WOLKEN *et al.*, 2002). Em alguns casos, o óleo apresentou maior atividade que o citral isolado, como reportado por SAIKIA e colaboradores (2001).

Para entender as propriedades do óleo de *C. citratus*, alguns autores buscaram relacionar sua atividade à sua composição química. ONAWUMNI e colaboradores (1984) demonstraram que o citral é o principal responsável pela atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo, o que corrobora com os estudos de ONAWUNMI (1989), que demonstraram a semelhança entre a atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo de *C. citratus* e o seu componente principal, o citral, sugerindo a viabilidade econômica de se utilizar o óleo em substituição ao componente majoritário.

3.1.2. Quantificação do óleo de *C. citratus*

Como a presença de citral está diretamente relacionada à atividade apresentada pelo óleo de *C. citratus*, é importante que se verifique o teor deste componente presente na amostra. Para compostos voláteis, a separação, identificação e quantificação de componentes são feitas, em sua grande maioria, através da técnica de cromatografia a gás (CG), que mostra alta sensibilidade na detecção de pequenas quantidades de substâncias (LOCWOOD, 2001). A Farmacopéia Brasileira (2003) descreve método por CG

para a quantificação de citral presente no óleo de *C. citratus*, cujas concentrações relativas são obtidas por integração eletrônica, através do cálculo do índice de Kovats.

A técnica de CG foi utilizada por diversos autores para quantificar citral e outros terpenos em estudos de degradação, na determinação de fragrâncias e controle de qualidade de óleos voláteis (STASHENKO *et al.*, 1996; ARAMENDÍA *et al.,* 1997; KIM *et al.*, 2000).

Alguns estudos utilizaram o método por CLAE para realizar a quantificação de compostos monoterpênicos, demonstrando sua viabilidade em substituição ao método por CG (TAO e PEREIRA, 1998; CHAN, 2001; RAUBER *et al*., 2005; VILLA *et al.*, 2007).

3.1.3. Estabilidade do óleo de *C. citratus* e do citral

O emprego de um composto volátil como produto farmacêutico implica cuidados relacionados a sua estabilidade. Os óleos voláteis apresentam elevada suscetibilidade à degradação, devido à instabilidade de suas moléculas. A degradação pode ser causada pela luz, calor ou pelo oxigênio atmosférico, levando à polimerização ou oxidação de substâncias, e pode ocorrer após longo período ou em condições inadequadas de estocagem. Os produtos de degradação formados, por sua vez, podem comprometer a qualidade do óleo reduzindo seu valor comercial ou, então, provocando reações alérgicas e irritantes, determinando seu emprego como um fator de risco. As reações de degradação podem ser prevenidas, conservando-se os óleos voláteis em embalagens apropriadas (neutras, como aço inoxidável, vidro âmbar), hermeticamente fechadas e acondicionadas em baixas temperaturas (TISSERAND, 1996).

Alguns estudos têm demonstrado o comportamento do óleo volátil de *C. citratus* e do citral quando submetidos a condições adversas, demonstrando a redução do teor do componente majoritário, bem como sua suscetibilidade à degradação térmica, ácida e oxidativa (FREEBURG *et al.*, 1994;

CHANFRAU *et al.*, 2003; UENO *et al.*, 2004; SILVA, 2005; DJORDJEVIC *et al.,* 2008). A cinética de degradação fotoquímica do óleo de *C. citratus* foi avaliada por SILVA (2005), demonstrando que a reação que melhor descreve a diminuição do teor de citral em função do tempo é a de ordem zero.

Com o objetivo de melhorar a estabilidade do óleo volátil, possibilitando empregá-lo em formulações farmacêuticas, o presente trabalho objetivou promover a proteção do mesmo através da preparação de micropartículas contendo tal substância, de forma que os componentes que possam vir a interferir na sua estabilidade sejam devidamente protegidos dos processos de degradação.

3.2. Microencapsulação

Micropartículas são sistemas micrométricos que variam de 1 a 1000 µm, e que compreendem, principalmente, as microcápsulas e microesferas. As microcápsulas são partículas esféricas com tamanho entre 50 e 2 mm, contendo uma substância como núcleo. As microesferas, por sua vez, são reservatórios micrométricos, que correspondem a partículas esféricas matriciais (THIES, 1996; RAVI KUMAR, 2000).

A microencapsulação tem sido amplamente estudada na área farmacêutica, visando o desenvolvimento de formas de liberação controlada (intrapulmonares, intranasais, intrarticulares), na obtenção de micropartículas gastroresistentes ou para melhora na estabilidade de fármacos. Os estudos buscam a estabilização de fármacos e proteínas frente a fatores que possam causar sua degradação, como a luz e o pH, ou então para mascarar características organolépticas (O´DONNELL e MCGINITY, 1997).

O processo de microencapsulação caracteriza-se pelo empacotamento de partículas envoltas em um filme, constituído, geralmente, de material polimérico, que libera seu conteúdo em condições pré-determinadas. Existem diversos tipos de micropartículas, dependendo do material encapsulante e do

método utilizado na preparação. O material do núcleo, ou seja, aquele a ser empacotado, pode ser composto de um ou diferentes ingredientes, enquanto que a membrana ou reservatório, que corresponde ao material encapsulante, pode ser de camada simples ou dupla (KRISHNAN *et al.,* 2005).

Diversos tipos de polímeros têm sido empregados na preparação de micropartículas, destacando-se, entre eles, os derivados de celulose – etilcelulose (YAMADA *et al.,* 2001; AL-OMRAN *et al*., 2002; WIELAND-BERGHAUSEN *et al*., 2002), acetoftalato de celulose (TAKENAKA *et al*., 1980), acetobutirato de celulose (LIU *et al.,* 2002), carmelose sódica (BILLON *et al.,* 2000; ONEDA; RÉ, 2003); os polímeros biodegradáveis – poli(ácido lático) (LACASSE *et al.,* 1998), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (CRUAUD, 1999; TUNCAY *et al.,* 2000; FREITAS *et al.,* 2005) e poli(ε-caprolactona) (LAMPRECHT *et al.,* 2000; BLANCO *et al.,* 2003; DOMINGUES, 2006; LEE; YOO, 2008); os poli(metracrilato de metila-co-ácido acrílico) - Eudragit L 100-55® (DELGADO *et al.,*1999), Eudragit NE 30D® (ONEDA; RÉ, 2003), Eudragit S100® (LEE *et al.*; 2000; EL-KAMEL *et al.,* 2001; PALMIERI *et al.,* 2002; RAFFIN *et al.,* 2006; RAFFIN *et al.,* 2007), os polissacarídeos – quitosana (HE *et al.,* 1999; RETHMEIER *et al.*, 2001), dextrana (FRANSSEN *et al.,* 1998) e os polímeros naturais - albumina (TUNCAY *et al.,* 2000; GIUNCHEDI *et al*., 1998 e gelatina (FRANSSEN *et al*., 1998; BRUSCHI *et al.*, 2003).

Para a escolha de um material apropriado a ser utilizado como matriz encapsulante, é importante conhecer as propriedades físicas e químicas desse material (BERISTAIN *et al.*, 2001). A natureza química do núcleo, peso molecular, funções químicas, polaridade, volatilidade e a concentração a ser utilizada, são fatores importantes do material a ser encapsulado, que devem ser considerados no momento da escolha do material encapsulante (BERTOLINI *et al*., 2001).

Diversos estudos avaliaram diferentes materiais encapsulantes na preparação de micropartículas contendo compostos voláteis, a fim de protegê-los de processos de oxidação e evaporação (ROSENBERG *et al.,* 1990; KIM *et al.*, 1996; KRISHNAN *et al.*, 2005; BARANAUSKIENE *et al.*, 2006).

Dentre os materiais poliméricos descritos para a encapsulação de monoterpenos, destacam-se a goma arábica, goma mesquita, diversos tipos de proteínas, dióxido de silício coloidal, gelatinas, maltodextrina, ciclodextrina, alginato de sódio e gelatina (KIM; MORR, 1996; ROSENBERG; SHEU, 1996; BERISTAIN *et al.,* 2001; BERTOLINI *et al.,* 2001; BRUSCHI *et al.,* 2003; KRISHNAN *et al.,* 2005).

Na busca de materiais poliméricos de revestimento com elevada eficiência na proteção de óleos voláteis, as ciclodextrinas têm sido amplamente estudadas. As mais comuns são a a, ß e ? ciclodextrinas, sendo a ß-ciclodextrina a mais utilizada na microencapsulação de substâncias (BHANDARI *et al.*, 1998; ZÉTOLA *et al.*, 2002; WALECZEK *et al.*, 2003; JEON *et al.*, 2003).

A escolha do método de preparação de micropartículas está diretamente relacionada ao fármaco, à natureza do polímero e à finalidade de uso pretendida. Independentemente do método escolhido, alguns requisitos devem ser obrigatoriamente alcançados, dentre eles: a estabilidade do fármaco não pode ser prejudicada durante o processo de microencapsulação; a taxa de encapsulação e o rendimento devem ser elevados e as micropartículas devem produzir um pó de fluxo livre, isento de agregação ou aderência (THIES, 1996).

O método de preparação das micropartículas influencia diretamente a liberação do fármaco, a eficiência da encapsulação e a estabilidade do polímero (O'DONNELL, 1998). Dentre os principais métodos utilizados na preparação das micropartículas, destaca-se a secagem por aspersão (SA), a precipitação, a coacervação complexa, a separação de fases poliméricas e a emulsificação-difusão/evaporação (THIES, 1996).

Para este trabalho optou-se por realizar a microencapsulação através de duas técnicas descritas: *spray drying* ou secagem por aspersão (SA) e a técnica de precipitação (PR).

A SA apresenta-se como um método vantajoso sob os seguintes aspectos: rapidez e etapa única de preparação, possibilidade de aplicar a fármacos termossensíveis e compostos voláteis, além da maior facilidade de

transposição de escala em relação a outros métodos de microencapsulação (ONEDA e RÉ, 2003). Além disso, a SA confere aos produtos secos um tamanho de partícula uniforme (AULTON, 2005), sendo utilizada como método de escolha em diversos trabalhos (ROSENBERG *et al*., 1990; BROADHEAD *et al*., 1992; GUTERRES *et al.*, 1995a; GUTERRES *et al.*, 1995b; BILLON *et al*., 2000; GUTERRES *et al.*, 2000; EDRIS; BERGNSTAHL, 2001; GUTERRES *et al.*, 2001; ESPOSITO *et al*., 2002; ALVES e SANTANA, 2004; PÉREZ-ALONSO *et al*., 2003).

A técnica de PR é, também, muito utilizada na microencapsulação de compostos voláteis, uma vez que proporciona alto rendimento e confere a proteção necessária aos componentes, sendo utilizada em diversos trabalhos com essa finalidade (KIM *et al.*, 1996; BHANDARI *et al.*, 1998; EL-KAMEL *et al.*, 2001; JEON *et al.*, 2003).

Os estudos citados anteriormente descrevem diversas técnicas para a caracterização das micropartículas preparadas, dentre as quais destacam-se a avaliação do rendimento do processo, taxa de encapsulação, perda por dessecação ou teor de umidade, observação morfológica através de microscopia eletrônica de varredura, tamanho de partícula e distribuição granulométrica, avaliação das propriedades tecnológicas, perfil de liberação, entre outros (ROSENBERG *et al.*, 1990; EDRIS e BERGNSTAHL, 2001; KRISHNAN *et al.*, 2005).

A caracterização das micropartículas é, portanto, uma importante ferramenta para determinar os parâmetros mais adequados para o processo, como a escolha entre diferentes materiais encapsulantes e/ou métodos de preparação, além de permitir a verificação das condições de proteção do material encapsulado.

4. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE CITRAL E DO ÓLEO DE *Cymbopogon citratus*

4.1. Introdução

A pureza das substâncias de referência é de fundamental importância para a validação de métodos analíticos e análise de amostras. A ANVISA reconhece duas categorias de padrões de referência: compendial ou não compendial (BRASIL, 2003). Os padrões de referência compendiais são obtidos de fontes como Farmacopéia Brasileira, The United States Phamacopoeia (USP) e European Pharmacopoeia (EP) e não necessitam de caracterização posterior. Os padrões de referência não compendiais são aqueles com elevado teor de pureza e que devem ser cuidadosamente caracterizados (SWARTZ; KRULL, 1998).

Como o citral padrão utilizado neste trabalho é classificado como não compendial, foi realizada sua caracterização utilizando a técnica de CG-DIC, conforme descrito na monografia da Farmacopéia Brasileira (2003) para o óleo volátil de *C. citratus*. Além disso, a atividade antifúngica da amostra comercial e do citral padrão foi avaliada por ensaio microbiológico – difusão em ágar com discos de papel. O método por CLAE-UV foi validado para quantificação dos isômeros do citral (neral e geranial) presentes no óleo de *C. citratus*.

4.2. Parte experimental

A seguir estão descritos os equipamentos e reagentes utilizados para o desenvolvimento dos estudos descritos nos capítulos a seguir. Se necessárias, outras especificações serão descritas quando pertinentes.

Os equipamentos e utensílios rotineiramente utilizados foram: Balança analítica OHAUS® modelo AP1105; Agitador mecânico IKA LABORTECHINIK modelo K5501; Pipeta Gilson® modelo Pipetman® P100; controlador de Pipeta Macro Brand para volume de 0,1 – 100,0 mL; Filtro de membrana Millex HN Nylon com diâmetro de poro nominal de 0,45 mm, corpo de polietileno com 13

mm de diâmetro da Millipore® empregado na filtração da fase móvel (FM) para CLAE e filtração do precipitado do complexo β–CD-óleo.

Os reagentes empregados foram: acetonitrila grau CLAE (Tedia®); Metanol grau CLAE (Tedia®); água ultrapura produzida pelo sistema de filtros Milipore Mili-Q; lauril sulfato de sódio (LSS) Synth, lote 84941.

Citral Padrão: adquirido da Aldrich®, lote S22116, com teor de pureza de 96,54%, conforme especificado pelo certificado de análise.

Amostra comercial de óleo de *C. citratus*: adquirido da destilaria Ferquima (São Paulo) em fevereiro de 2007, lote 169.

Nistatina Padrão: adquirido da Schemicals® com 5552 UI/mg.

4.3. Caracterização do citral padrão e do óleo de *C. citratus* por CG-DIC

As amostras de citral padrão e do óleo volátil de *C. citratus* foram submetidas à análise por CG-DIC, conforme doseamento descrito na monografia do Capim-limão presente na Farmacopéia Brasileira (2003). As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Perkin Elmer (Autosystem XL, Shelton, USA), equipado com detector de ionização de chamas (CG/DIC), utilizando como gás de arraste nitrogênio (1 ml/min), a uma pressão de 80 kPa; coluna capilar de 30 m de comprimento e 0,25 μm de diâmetro interno, preenchida com polidifenildimetilsiloxano, com espessura de filme de 0,25 μm; temperatura da coluna de 60 ºC a 300 ºC, a 15 ºC por minuto (total de 20 minutos); temperatura do injetor a 220 ºC e temperatura do detector a 250 ºC. Para realização das análises, procedeu-se a diluição do óleo em éter etílico, na razão de 2:100, injetando-se a quantidade de 1 μL da amostra.

A análise por CG-DIC foi realizada para determinação dos teores de neral e geranial, através das concentrações relativas, em porcentagens, obtidas por integração eletrônica. Além disso, os constituintes foram

caracterizados através da determinação do Índice de Kovats, calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IK = 100xn + \frac{(100x\ (tr_X - tr_Z)}{(tr_{Z+1} - tr_Z)} \qquad \textbf{Equação 1}$$

Onde: n = número de átomos de carbono do alcano de menor peso molecular; tr_x = tempo de retenção do composto "x" (intermediário a tr_z e tr_{z+1}); tr_z = tempo de retenção do alcano com "n" carbonos; tr_{z+1} = tempo de retenção do alcano com "n + 1" carbonos;

4.3.1. Resultados e discussão

A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido para o citral padrão e a amostra comercial do óleo de *C. citratus*. Os picos mais intensos correspondem ao neral e geranial, respectivamente.

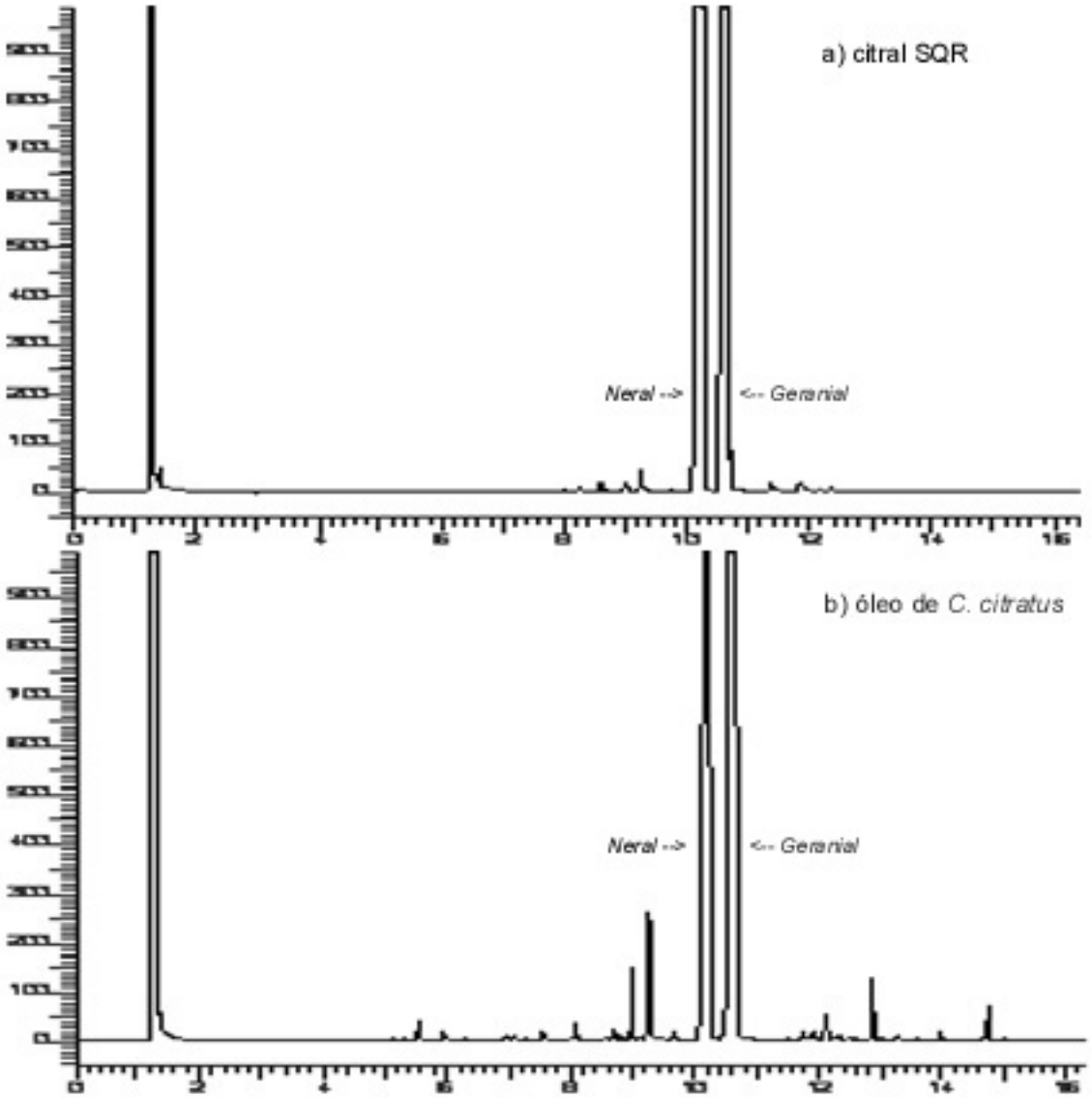


FIGURA 2. Cromatogramas obtidos por CG-DIC. a) citral padrão; b) óleo de *C. citratus*.

A porcentagem de cada componente é determinada por normatização e os resultados da análise estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados da análise por CG-DIC do citral padrão e óleo de *C. citratus*.

Amostra	Neral (%)	Geranial (%)	Citral (%)
Citral Padrão	**47,6**	**49,5**	**97,1**
Óleo de *C. citratus*	**33,5**	**44,6**	**78,1**

Os resultados demonstraram um teor de neral de 33,5% e de geranial de 44,6% na amostra de óleo de *C. citratus*. Dessa forma, a quantidade de citral encontrada no óleo foi de 78,1%, o que está de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2003), que preconiza que o óleo deve ser constituído de no mínimo 60% de citral. Além disso, os resultados dos teores de neral e geranial encontrados corroboram com os dados descritos na literatura, que determinam o teor de 70 a 80% de citral presente no óleo volátil (RAUBER, 2001; SILVA, 2005).

Baseado nos resultados obtidos pela análise por CG-DIC, bem como a análise macroscópica do óleo, que determinou coloração amarelo clara e odor característico, a amostra comercial do óleo volátil foi considerada adequada para dar continuidade aos experimentos.

4.4. Avaliação da atividade antifúngica do óleo de *C. citratus*

O óleo volátil de *C. citratus* foi avaliado em relação a sua atividade antifúngica, através do método de difusão em ágar com discos de papel (6,6 mm), frente à espécie de *Candida albicans* ATCC 10231 (F.BRAS. IV, 1988; SCHUCK *et al*., 2001; SILVA, 2005).

Os equipamentos rotineiramente utilizados neste teste foram: estufa biomatic; estufa HERAEUS – B 5042; fluxo laminar horizontal VECO; Autoclave PHOENIX – AV 50; banho-maria FANEM; fotocolorímetro Analyser 800, São Paulo, Brasil; paquímetro Digital Starret® - Série 727, Itu, Brasil.

O meio de cultura utilizado nos testes foi Ágar Sabouraud Dextrose 4%, Merck®, preparado dissolvendo-se 65 g em 1,0 L de água, solubilizado em forno de microondas e esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 minutos, em pressão de 1,5 atm.

A solução salina utilizada para preparação da suspensão contendo o microrganismo foi preparada dissolvendo-se 0,9 g de NaCl em 100 mL de água e esterilizada em autoclave a 121 °C, por 15 minutos, em pressão de 1,5 atm.

A cepa de *C. albicans* ATCC 10231 foi mantida em ágar Sabouraud dextrose 4%, em tubo inclinado, em geladeira. Previamente à realização do teste, a cepa foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose a 4%, por 48 horas, a 25 °C.

A vidraria utilizada no ensaio foi esterilizada em estufa, a 180 °C, por duas horas.

A preparação da solução padrão foi realizada dissolvendo-se, previamente, a Nistatina Padrão em metanol, em BV de 10 mL; desta solução, transferiu-se alíquota de 1 mL em BV de 10 mL, utilizando água estéril como diluente, obtendo-se uma concentração final de 0,3 mg/mL. A mesma diluição foi utilizada para a preparação do controle negativo (branco).

A preparação dos discos de papel contendo as amostras foi realizada impregnando-se 20 µL de solução padrão e branco nos discos. Para o óleo e o citral, foram impregnadas as quantidades de 2,0; 4,0 e 8,0 µL. Foram preparados 6 discos para cada amostra, colocados, individualmente, em placas de petri, e, posteriormente, acondicionados em dessecador a vácuo, na geladeira, por 24 horas.

A suspensão do microrganismo foi preparada em solução salina estéril, em fotocolorímetro, com 25% ± 2% de transmitância, a 580 nm. Após, a preparação do inóculo, na concentração de 1%, foi realizada transferindo-se a suspensão para erlenmeyer contendo meio de cultura, mantido em banho-maria a 37 ± 2 °C.

Em capela de fluxo laminar, foram transferidos 20 mL de meio de cultura para as placas, seguindo-se, após a solidificação da camada base, a adição de 5 mL de inóculo. Após a solidificação do inóculo, os discos foram adicionados às placas, que foram, posteriormente, incubadas à temperatura de 35 °C ± 2 °C, por 24 horas. A leitura do diâmetro dos halos de inibição foi realizada com auxílio de paquímetro digital.

4.4.1. Resultados e discussão

Os diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil, bem como da substância de referência, o citral, frente a *C. albicans*, estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2. Diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e citral.

	Óleo			Citral				
Quantidade (µL)	2,0	4,0	8,0	2,0	4,0	8,0	**Padrão**	**Branco**
Diâmetro dos halos (mm)	19,20	28,49	> 40	20,92	29,43	> 40	18,98	Resistente
	19,15	28,24	> 40	20,94	29,38	> 40	18,89	Resistente
	19,10	28,66	> 40	20,87	29,47	> 40	18,92	Resistente
	18,99	28,68	> 40	20,96	29,53	> 40	18,97	Resistente
	18,97	28,51	> 40	20,95	29,45	> 40	19,20	Resistente
	19,01	28,65	> 40	20,90	28,99	> 40	19,01	Resistente
Médias	19,07	28,54	> 40	20,92	29,37	> 40	18,99	Resistente

A análise dos resultados obtidos demonstrou que a amostra comercial do óleo volátil de *C. citratus* apresentou atividade frente à *C. albicans*, assim como o citral padrão. Além disso, a proximidade entre os valores dos halos demonstra a semelhança na atividade apresentada por ambos.

As amostras de 2,0 µL de óleo e de citral apresentaram halos de inibição muito semelhantes aos apresentados por 20 µL da nistatina padrão. A comparação dos halos demonstrou que 1 µg do citral padrão apresentou a potência equivalente a 4,3 µg da nistatina. Este resultado demonstra a maior potência do citral em relação à nistatina no ensaio *in vitro*.

Para as amostras de 4,0 e 8,0 µL, observou-se uma diminuição do crescimento da levedura ao redor de halo de inibição. Esta observação corrobora com os resultados apresentados por SILVA (2005), que os atribui a uma possível volatilização do óleo na placa, acarretando diferentes concentrações de vapor em determinadas regiões da mesma, o que levaria, por sua vez, à formação de halos pouco nítidos.

A partir dos halos de inibição do citral padrão e da amostra de óleo de *C. citratus*, foi determinada a potência da matéria-prima vegetal (MPV), empregando-se método descrito na Farmacopéia Brasileira (1988). A potência determinada para o óleo de *C. citratus* foi de 92,4%. Apesar da MPV ser constituída de apenas 76,7% de citral, a potência apresentada em relação à atividade antifúngica pode ser atribuída ao sinergismo ocorrido com alguns componentes minoritários presentes na MPV, o que corrobora com os estudos de ONAWUNMI e colaboradores (1984).

A medida dos halos de inibição deste estudo foi comparada com os resultados de estudo anteriores, a fim de verificar a atividade antifúngica apresentada por diferentes amostras do óleo de *C. citratus.* A Tabela 3 apresenta a comparação dos resultados obtidos.

TABELA 3. Comparação dos resultados obtidos com os descritos por RAUBER (2001) e SILVA (2005) na avaliação da atividade antifúngica do óleo de *C. citratus* frente a C. albicans ATCC 10231.

	Diâmetro dos halos de inibição (mm)		
Quantidades de óleo testadas (µL)	Amostras coletadas em Viamão/RS	Amostra comercial Destilaria Maripá/PR	Amostra Comercial Ferquima/SP
2,0	13 a 18	18,6	19,1
4,0	> 25	27,4	28,5
8,0	> 40	> 40	> 40
Teor de citral (CG)	76,3	75,9	78,1
Referência	RAUBER (2001)	SILVA (2005)	

A análise comparativa demonstra que amostras do óleo de *C. citratus* provenientes de diferentes fornecedores, possuem valores semelhantes de teores de citral, o que, por sua vez, está diretamente relacionado ao diâmetro dos halos de inibição encontrados, que foram, também, semelhantes. Isso corrobora com os dados da literatura que atribuem a atividade antifúngica apresentada pelo óleo frente à *C.albicans* ao seu componente majoritário, o citral (ONAWUNMI *et al.*, 1984; ONAWUNMI, 1989).

4.5. Validação de método analítico por CLAE para a quantificação de neral e geranial presentes no óleo *C. citratus*

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica versátil e seletiva, amplamente empregada para a quantificação de substâncias, sendo a técnica de escolha na indústria farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos, além de ser o método mais preconizado pelos códigos oficiais (F. BRAS, IV, 1998; WATSON, 2005c; BRITISH, 2007; USP 31, 2008).

Para o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para a quantificação do citral, o componente majoritário presente no óleo volátil de *C. citratus*, foi realizada a busca de métodos de análise para monoterpenos, bem como, os estudos existentes para a quantificação do citral através de técnicas por CLAE, demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4. Métodos de análise por CLAE para determinação de monoterpenos e citral, encontrados na literatura.

Coluna / Detecção	Fase móvel	Referência
Whatman Parispher C18 / UV 220 nm	Metanol: Água (72:28)	TAO, L.; PEREIRA, M.A., 1998
Phenomenex Hypersil 5CN / UV 245 e 265 nm	n-hexano	HUDAIB *et al*., 2001
Supelco LC-ABZ / UV 240 nm	Acetonitrila: Fosfato de Amônio (50:50) pH=3,1 (ácido fosfórico)	FRIEDMAN *et al*., 2004
Water C_{18} / UV 210nm	Acetonitrila: Água (40:60)	GUPTA, A.K.; MYRDAL, P.B., 2004
Spherisorb CN / UV 233 nm	n-hexano:etanol (85:15)	RAUBER *et al*., 2005
Li Chro-cart Purospher Star RP18C_{18} / UV 210, 254 e 280 nm	Gradiente ACN: água	VILLA *et al*., 2007

Embora a Farmacopéia Brasileira (2003) preconize a quantificação do conteúdo de citral presente no óleo volátil de *C.citratus* através da técnica de CG, segundo a revisão da literatura, a CLAE, pode também ser empregada para a determinação de monoterpenos em preparações farmacêuticas ou materiais biológicos. A técnica pode ser utilizada isoladamente ou, então,

associada a técnicas complementares, como CG, espectrometria de massas, entre outras. Aliado aos dados obtidos a partir da revisão, o objetivo foi desenvolver e validar um método por CLAE capaz de quantificar os isômeros neral e geranial presentes no óleo volátil de *C. citratus,* com precisão e exatidão.

4.5.1. Condições cromatográficas

A fase móvel (FM) utilizada no teste foi preparada com acetonitrila grau CLAE (Tedia®), metanol grau CLAE (Tedia®) e água ultra pura produzida pelo sistema de filtros e resinas da Milipore Mili-Q.

As soluções analisadas por CLAE foram previamente filtradas com filtro de membrana Milipore® Milex HN Nylon, com abertura de poro nominal de 0,45 µm e corpo de polietileno de 47 mm de diâmetro interno.

Para a realização das análises utilizou-se cromatógrafo a líquido, marca AGILENT, modelo 1200 Series, equipado com 4 bombas de fluxo G1311A, injetor automático G1329A, termostato G1330B, desaerador G1322A, detector de arranjo de diodos G1322A e operado pelo programa Agilent ChemStation. As condições cromatográficas utilizadas na validação estão resumidas na Tabela 5.

TABELA 5. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE para determinação de citral presente no óleo volátil de *C. citratus*.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel (FM)	Acetonitrila: água: metanol (50:40:10)
Fluxo[a]	1,2 mL/min
Coluna	ACE® C18 (250 mm X 4 mm, 5 µm)
Detecção	Quantificação em 240 nm.
Temperatura do forno	30 ºC
Volume injetado	20 µL
Programa Agilent Chemstation B.02.01	Aquisição, tratamento e apresentação dos resultados

[a] pressão obtida próxima a 110 bar.

As quantidades de neral e geranial no padrão de citral utilizadas na validação descrita a seguir foram de 47,6 e 49,5%, respectivamente. Estes foram os resultados obtidos para o padrão empregando a técnica de CG-DIC descrita na Farmacopéia Brasileira (2003), pois o certificado de análise do fornecedor do padrão determina a quantidade de citral por CG (95%), porém não caracteriza os isômeros.

Os seguintes parâmetros de desempenho analítico foram avaliados a fim de assegurar a credibilidade do método empregado para quantificação dos isômeros do citral: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (F.BRAS, 2003; ICH, 2003; USP 31, 2008).

4.5.2. Desenvolvimento de método por CLAE-UV para quantificação do neral e geranial em amostra de óleo de *C. citratus*.

O desenvolvimento do método por CLAE-UV iniciou-se através da avaliação de soluções de citral padrão com concentração aproximada de 200 μg/mL e geraniol a 50 μg/mL. Empregando como FM acetonitrila:água (1:1) e fluxo de 1,0 mL/min, avaliou-se colunas C8 e C18.

A Figura 3 apresenta o cromatograma em 210 nm para coluna C8. Verifica-se a presença de pico intenso com tempo de retenção inferior a 4 min relativo ao citral e outro pico intenso do geraniol inferior a 2 min. Não houve indício da separação dos isômeros do citral neste caso.

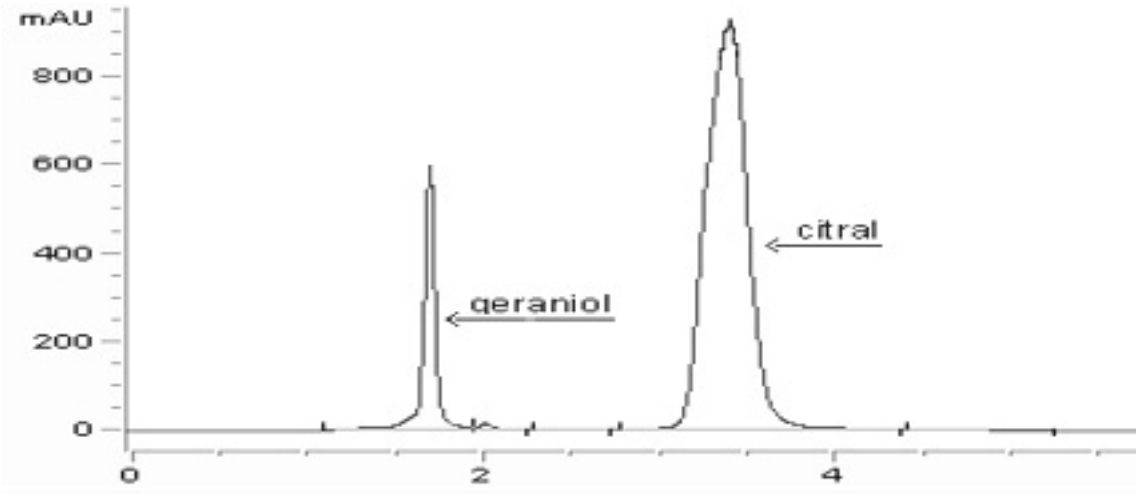


FIGURA 3. Cromatograma em 210 nm de solução contendo citral e geraniol em coluna C8. Fluxo de 1,0 mL/min; FM acetonitrila:água (1:1).

A coluna C18 apresentou potencial para separação dos isômeros do citral e a separação foi satisfatória com a seguinte FM: acetonitrila:água:metanol (5:4:1). A Figura 4 apresenta cromatograma obtido com a FM descrita, fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 240 nm.

Nesta situação, os isômeros foram separados em aproximadamente 12 min de análise. O geraniol não possui absortividade em 240 nm, porém em 210 nm foi possível verificar o pico deste composto em aproximadamente 10,5 min.

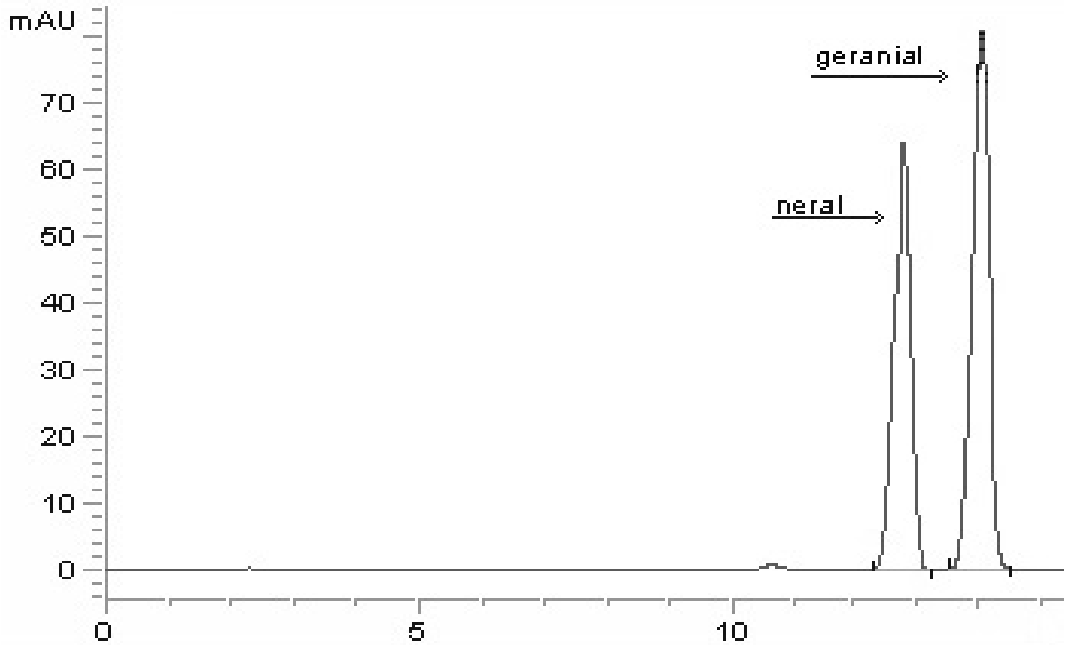


FIGURA 4. Cromatograma em 240 nm de solução contendo citral e geraniol em coluna C18. Fluxo de 1,0 mL/min; FM acetonitrila:água:metanol (5:4:1).

Para reduzir o tempo de análise, o fluxo foi aumentado para 1,2 mL/min, obtendo-se tempo de retenção para os isômeros do citral entre 8 – 9 min (Figura 5). Os picos mantiveram-se separados e o geraniol apresentou pico próximo a 7 min, detectado em 210 nm.

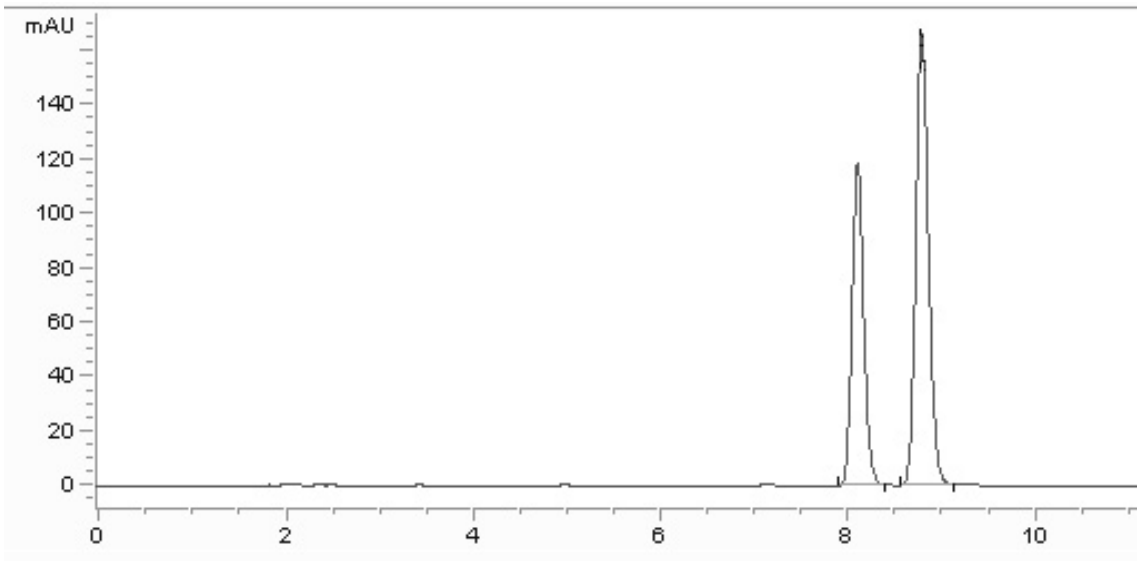


FIGURA 5. Cromatograma em 240 nm de solução contendo citral e geraniol em coluna C18, com fluxo de 1,2 mL/min e FM acetonitrila:água:metanol (5:4:1).

As condições cromatográficas otimizadas para separação dos isômeros do citral foram: coluna C18, FM acetonitrila:água:metanol (5:4:1), fluxo de 1,2 mL/min e detecção em 240 nm.

A identidade dos picos do neral e do geranial no método por CLAE-UV foi inferida a partir dos resultados obtidos por CG-DIC. A amostra de óleo de *C. citratus* analisada por CG-DIC apresentou maior quantidade de geranial em relação ao neral. Desta forma o pico com maior altura e área observado no método por CLAE-UV foi identificado como geranial. Assim, o pico com maior tempo de retenção na Figura 5 refere-se ao geranial.

A Figura 6 apresenta os espectros dos isômeros do citral. O geranial possui máximo de absorção em 241 nm enquanto que o neral apresenta máximo em 239 nm. O comprimento de onda selecionado para o método por CLAE foi de 240 nm, de maneira a atender os dois isômeros.

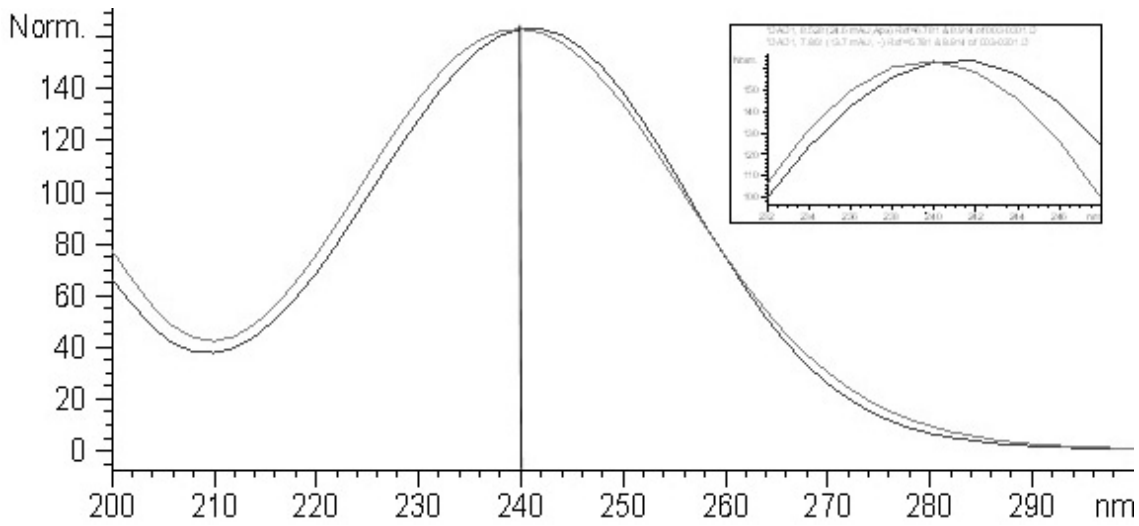


FIGURA 6. Espectros de absorção no UV dos isômeros do citral. Comprimento de absorção máximo do neral = 239 nm; geranial = 241 nm.

4.5.3. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da verificação da influência do geraniol e do mirceno, componentes minoritários do óleo de *C. citratus*, na análise do neral e geranial, em amostras do óleo e do padrão de citral.

As soluções para análise foram preparadas como descrito a seguir:

- *Solução amostra (*óleo de *C. citratus):* transferiu-se 100 µL de óleo de *C. citratus* para BV 100 mL e completou-se o volume com metanol. O BV deveria conter aproximadamente 20 mL de metanol para que o óleo fosse dissolvido no solvente e, desta forma, fosse minimizada a volatilização do óleo. Transferiu-se 2 mL (PV) da solução anterior para BV 50 mL e completou-se o volume com FM.

- *Solução padrão:* transferiu-se 100 µL de citral padrão para BV 100 mL, contendo aproximadamente 20 mL de metanol, e completou-se o volume com metanol. Transferiu-se 2 mL da solução anterior para BV 50 mL e completou-se o volume com FM.

- *Solução geraniol:* 20 µL de geraniol foram transferidos com para BV de 20 mL, contendo aproximadamente 10 mL de metanol, e o volume

completado com metanol. Transferiu-se 1 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

- *Solução mirceno:* 100 µL de mirceno foram misturados com 300 µL de óleo de *C. citratus*. Foram transferidos 20 µL da mistura de mirceno + óleo para BV de 20 mL, contendo aproximadamente 10 mL de metanol, e o volume completado com metanol. Transferiu-se 1 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

4.5.3.1. Resultados e discussão

A Figura 7 apresenta os crormatogramas do geraniol e do citral onde pode-se verificar os diferentes tempos de retenção do geraniol e dos isômeros do citral (neral e geranial). Além disso, o geraniol não absorve em 240 nm e, por isso, o cromatograma do geraniol é apresentado em 210 nm. Estes resultados confirmam a especificidade do método em relação ao geraniol.

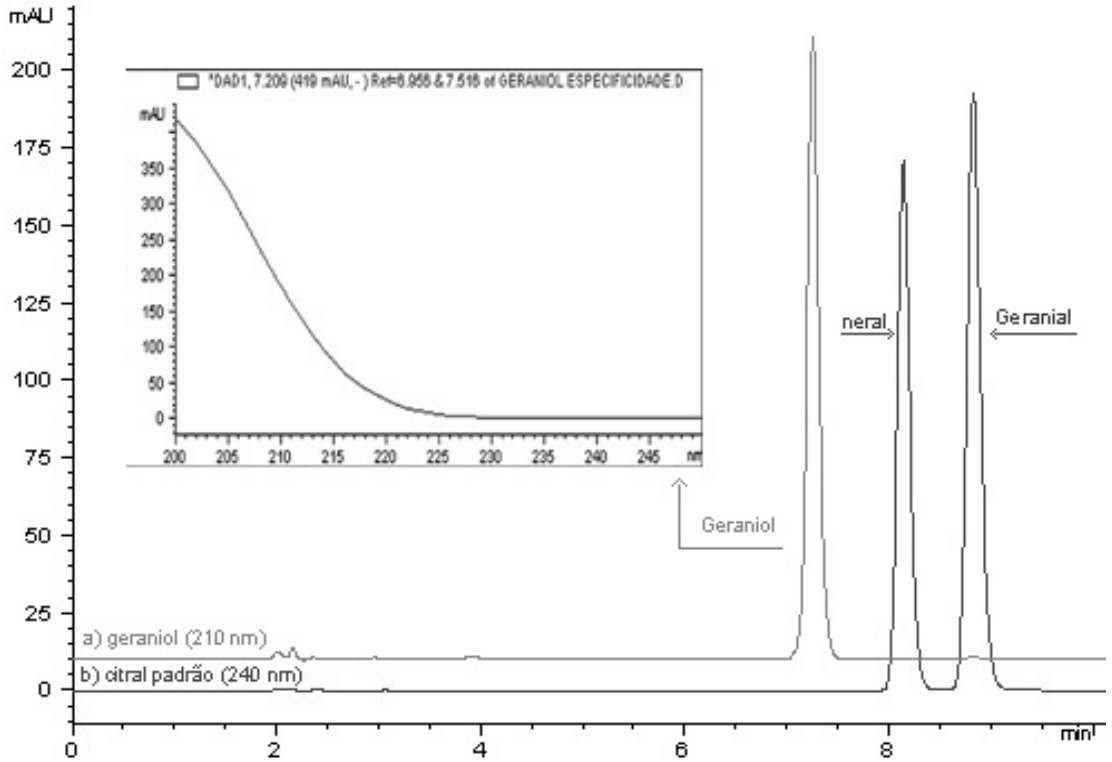


FIGURA 7. Cromatogramas para determinação da especificidade da MPV e espectro de absorção no UV do geraniol (200 – 250 nm). a) Geraniol (210 nm); b) citral padrão (neral e geranial) (240 nm).

A Figura 8 apresenta o cromatograma obtido com a solução contendo óleo de *C. citratus* e mirceno. O mirceno apresentou tempo de retenção próximo a 40 min, não interferindo na resposta dos isômeros do citral. O mirceno possui máximo de absorção no UV próximo a 225 nm e em 240 nm possui baixa absortividade, porém suficiente para apresentar sinal no cromatograma. A análise empregou a mistura de mirceno e óleo de *C. citratus*, pois o mirceno sozinho não possui solubilidade na FM e precipita.

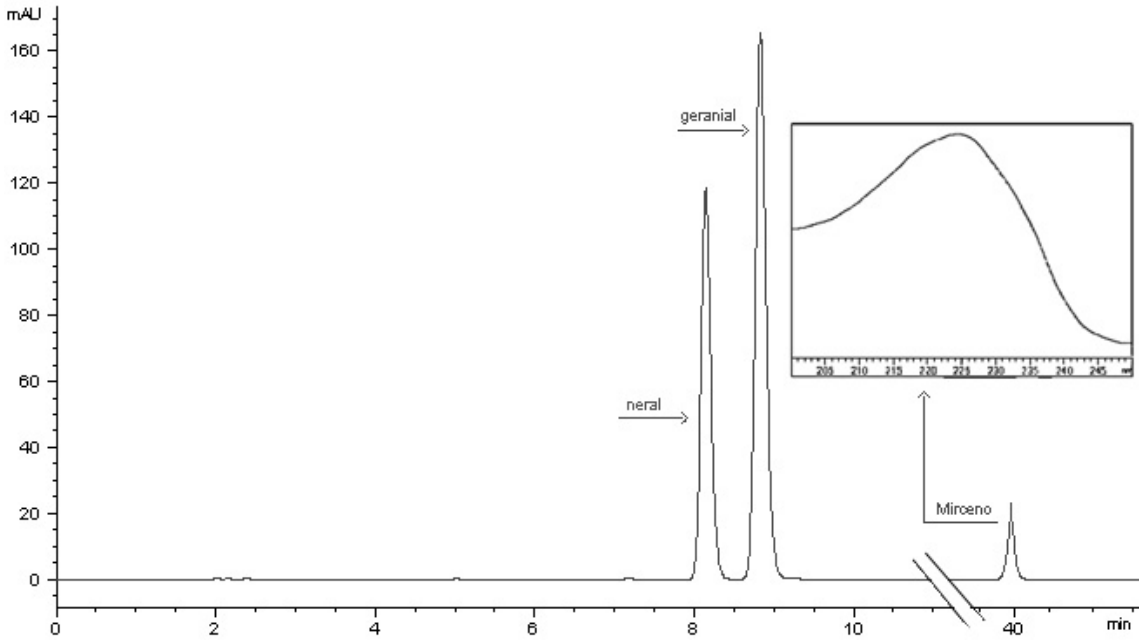


FIGURA 8. Cromatogramas para determinação da especificidade da MPV, em 240 nm, e espectro de absorção no UV do mirceno (200 – 250 nm).

Não se observa, no pico do neral e geranial, indício visual de ombro, vale ou assimetria excessiva que podem ser associados à presença de interferentes (Figura 8). Além disso, os picos dos isômeros estão bem separados, possibilitando a análise da pureza de pico.

A análise da pureza do pico da solução amostra foi realizada para confirmar que o neral e geranial não coeluem com nenhum dos muitos componentes minoritários do óleo de *C. citratus*.

A pureza do pico do neral e geranial foi avaliada através da comparação do espectro registrado no ápice do pico com os espectros registrados dentro do pico cromatográfico. Através de algoritmos são gerados valores de similaridade

entre cada espectro registrado e o espectro do ápice do pico (STAHL, 2003). Parâmetros relevantes para análise da pureza do pico foram fixados no programa Agilent Chemstation. A freqüência de aquisição de espectros foi de 1 s^{-1}; a faixa do espectro utilizado para comparação foi de 210 – 280 nm.

A Figura 9 mostra que não foi detectada impureza nos picos do neral e geranial. Os valores do índice de pureza total do neral (999,9) e geranial (999,9) indicam a pureza destes picos e a verificação de que a linha "threshold" não intercepta a linha da similaridade, confirma a pureza dos picos.

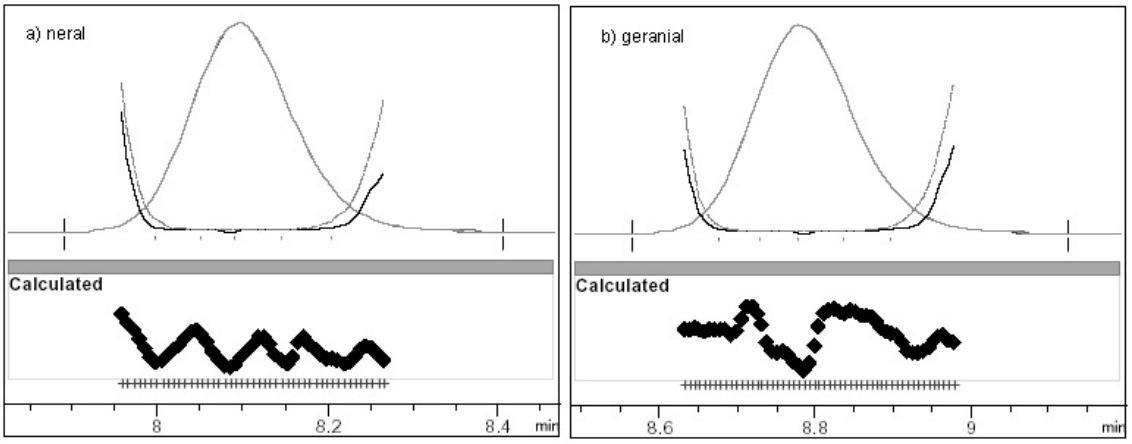


FIGURA 9. Avaliação da pureza dos picos do neral e geranial em amostras de óleo de C. citratus. a) Perfil de pureza do pico do neral; b) Perfil de pureza do pico do geranial.

Desta forma, a especificidade do método proposto é assegurada, pois os principais interferentes presentes em amostras de óleo de *C. citratus* não influenciam a análise do neral e geranial e o teste de pureza do pico não detectou impureza nos picos do neral e geranial.

Além disso, a amostra comercial de óleo de *C. citratus*, empregada neste estudo, não apresentou pico para o mirceno. Esta situação possibilitou estipular o tempo de análise da amostra em 10 min.

4.5.4. Linearidade

A linearidade do método proposto foi realizada através da análise da curva analítica obtida a partir dos resultados das áreas dos picos de neral e geranial em soluções de citral padrão com concentrações crescentes. Foram utilizadas 5 concentrações crescentes de citral padrão correspondentes à faixa de 50 – 150%. As amostras foram preparadas como segue:

- *Solução citral padrão*: Transferiu-se 100 µL de citral padrão para BV 25 mL e completou-se o volume com metanol. O BV deveria conter aproximadamente 20 mL de metanol para que o óleo fosse dissolvido no solvente e, desta forma, fosse minimizada a volatilização do óleo. Transferiu-se 2 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM (Solução estoque – SE). Transferiu-se a SE para bureta de 10 mL e adicionou-se os volumes indicados na Tabela 6 para BV 20 mL completando o volume com FM.

Tabela 6. Preparação da curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE para MPV.

Amostra	Volume de Solução Estoque (SE) (mL)	Concentração de Neral (µg/mL)[a]	Concentração de Geranial (µg/mL)[b]
1	1,0	6,8	7,0
2	1,5	10,2	10,6
3	2,0	13,5	14,1
4	2,5	16,9	17,6
5	3,0	20,3	21,1

[a] Calculado empregando a Equação 2, sendo d_p = 0,8894; v_p = 100 µL; T_{neral} = 0,476.

[b] Calculado empregando a Equação 3, sendo d_p = 0,8894; v_p = 100 µL; $T_{geranial}$ = 0,495.

Foram preparadas 3 curvas analíticas a partir de 3 soluções estoque.

As concentrações de neral e geranial foram obtidas através das seguintes equações (Origem das equações em Anexo):

$$[\text{neral}] = \frac{d_p \times v_p \times T_{neral} \times V_{SE}}{6{,}25} \qquad \textbf{Equação 2}$$

Onde: [neral] = concentração de neral em µg/mL; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; v_p = volume de citral padrão em µL; T_{neral} = teor de neral no citral padrão; V_{SE} = volume de solução estoque em mL.

$$[\text{geranial}] = \frac{d_p \times v_p \times T_{geranial} \times V_{SE}}{6{,}25} \qquad \textbf{Equação 3}$$

Onde: [geranial] = concentração de geranial em µg/mL; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; v_p = volume de citral padrão em µL; $T_{geranial}$ = teor de geranial no citral padrão; V_{SE} = volume de solução estoque em mL.

4.5.4.1. Resultados e discussão

Os resultados obtidos no ensaio da linearidade para o neral e geranial estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Resultados das áreas dos picos do neral e geranial para diferentes concentrações destas substâncias no ensaio de linearidade - método por CLAE-UV para MPV*.

Concentração Neral (µg/mL)	Área do pico do Neral		
	Curva A	Curva B	Curva C
6,8	639,3	628,0	590,5
10,2	948,8	933,5	889,4
13,5	1246,9	1223,4	1206,1
16,9	1580,6	1533,9	1504,1
20,3	1889,4	1847,3	1789,4
Concentração Geranial (µg/mL)	**Área do pico do Geranial**		
	Curva A	**Curva B**	**Curva C**
7,0	776,3	763,7	718,6
10,6	1154,4	1136,1	1083,2
14,1	1523,6	1488,5	1466,8
17,6	1922,8	1868,2	1840,4
21,1	2300,3	2254,8	2182,4

* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

A análise da regressão linear empregou o programa Excel® e os principais resultados encontram-se resumidos na Tabela 8.

TABELA 8. Resultados da análise da regressão linear do neral e geranial no ensaio da linearidade - método por CLAE-UV para MPV.

Isômero	Coeficiente angular	Intercepto	Coeficiente de Correlação (r)	Erro Padrão da Regressão	DPR_{reg} (%)
Neral	90,38	5,57	0,9978	30,596	2,50
Geranial	106,15	3,23	0,9980	36,134	2,42

Os coeficientes de correlação próximos a 1,00 indicam a forte correlação existente entre as concentrações e as áreas dos picos do neral e geranial. A precisão dos resultados obtidos no teste da linearidade pode ser estimada com a seguinte equação (ERMER, PLOSS, 2005):

$$DPR_{reg} = \frac{EPR}{b \times \overline{X}} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 4}$$

Onde: DPR_{reg} =Desvio padrão relativo da regressão em %; EPR = Erro Padrão da Regressão; b = coeficiente angular da reta; $\overline{X}$ = concentração média das amostras analisadas na curva analítica.

Os valores de DPR_{reg} próximos a 2,5% indicam boa precisão para análise da MPV, considerando que o citral padrão é amostrado por volume, com auxílio de micropipeta. Além disso, não se verificou tendência na análise dos resíduos, o que demonstra a adequação do modelo linear de primeiro grau utilizado. Os valores de resíduo padronizado tiveram valores entre -2,0 e 2,0 sem indicação de presença de *outlier*. Desta forma, os resultados do teste de linearidade foram considerados satisfatórios para os isômeros do citral.

4.5.5. Precisão

A precisão do método analítico foi realizada através da repetibilidade e da precisão intermediária. A determinação da repetibilidade foi realizada

através da determinação do DPR de sete amostras do óleo de *C. citratus* e a precisão intermediária foi avaliada a partir da determinação do DPR entre os resultados obtidos em três dias de análise empregando dois analistas. O preparo das amostras foi realizado de acordo com o procedimento descrito a seguir:

- *Solução amostra:* transferiu-se 100 µL de óleo de *C. citratus* para BV 25 mL, contendo 20 mL de metanol, completando-se o volume com metanol. Desta solução, transferiu-se alíquota de 2 mL para BV 25 mL e completou-se o volume com FM. Transferiu-se , então, 2 mL da solução anterior para BV 20 mL e completou-se o volume com FM. Foram preparadas 7 réplicas.

- *Solução padrão:* transferiu-se 100 µL de citral para BV 25, seguindo as diluições semelhantes à preparação da *solução amostra*. Foram preparadas 2 réplicas da solução padrão.

A utilização de duas soluções padrão tem como objetivo melhorar a exatidão dos resultados e a precisão intermediária. Este artifício pouco comum para métodos por CLAE-UV foi utilizado, pois a amostragem do padrão é feita por volume e não pesagem.

As porcentagens de neral e geranial, no óleo de *C. citratus*, foram calculadas com as seguintes equações (Origem das equações em Anexo):

$$\%_{neral} = \frac{d_p \times T_{Neral} \times A_a}{A_p \times d_a} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 5}$$

Onde: $\%_{neral}$ = porcentagem de neral na amostra de *C. citratus*; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; T_{neral} = teor de neral no citral padrão; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; d_a = densidade da amostra de *C. citratus*.

$$\%_{geranial} = \frac{d_p \times T_{geranial} \times A_a}{A_p \times d_a} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 6}$$

Onde: $\%_{geranial}$ = porcentagem de geranial na amostra de *C. citratus*; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; $T_{geranial}$ = teor de geranial no citral padrão; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; d_a = densidade da amostra de *C. citratus*.

A porcentagem de citral foi determinada através da soma das quantidades encontradas de neral e geranial.

4.5.5.1. Resultados e discussão

A Tabela 9 apresenta os resultados do ensaio de precisão e demonstram a baixa variabilidade obtida entre os resultados de um mesmo dia. Os valores de DPR para todos os dias foram menores que 3,0% indicando que o método possui repetibilidade. A precisão intermediária é representativa da variabilidade dos resultados obtidos em um mesmo laboratório e verifica se o método fornece os mesmos resultados com variações como: diferentes dias e analistas. O DPR, que representa a variação relativa de todos os resultados, foi menor que 3,0% indicando que o método possui precisão intermediária adequada para análise do óleo de *C. citratus.*

TABELA 9. Resultados do ensaio de precisão na determinação de neral e geranial em amostra de óleo de *C. citratus*.*

Ensaio	Neral		Geranial		Citral	
Repetibilidade	**$\%_{neral}$**	**DPR (%)**	**$\%_{geranial}$**	**DPR (%)**	**$\%_{citral}$**	**DPR (%)**
Analista1/Dia1[a]	32,4	2,6	42,8	2,6	78,5	1,6
Analista2/Dia2 [a]	33,6	1,6	44,8	1,6	76,5	2,1
Analista2/Dia3 [a]	32,7	2,3	43,9	2,0	75,2	2,6
Precisão Intermediária[b]	32,9	2,7	43,8	2,8	76,7	2,7

[a] n = 7; [b] n = 21.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

De maneira geral, para análise de formas farmacêuticas com fármaco em macro quantidades, DPR < 2,0% é normalmente considerado satisfatório para o teste de precisão (SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Os valores de precisão intermediária e repetibilidade maiores que 2,0% foram associados à amostragem do óleo de *C. citratus* com micropipeta, porém considerado adequado para determinação de neral e geranial no óleo. Além disso, os valores de DPR determinados estão de acordo com a RE 899/03 que determina DPR < 5,0% para o teste de precisão.

O emprego da mesma ponteira para amostragem do citral padrão e da amostra (óleo de *C. citratus*) apresentaram menor variação no teste de precisão e, por isso, foi utilizada uma ponteira por dia de análise.

4.5.6. Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de adição de padrão. Quantidades conhecidas de geraniol e mirceno foram adicionadas a soluções contendo citral padrão. Foram realizados 5 níveis de concentrações diferentes, com três réplicas para cada nível, contemplando o intervalo linear. As soluções mãe (SM) foram preparadas conforme a Tabela 10 utilizando BV 25 mL e metanol como diluente.

TABELA 10. Preparação das soluções mãe (SM) para a realização da exatidão do método analítico por CLAE-UV através do ensaio de recuperação.

Amostra	Citral Padrão (mL)	Mirceno (mL)	Geraniol (mL)
A	100	10	10
B	100	10	10
C	100	10	10
Padrão1	100	---	---
Padrão2	100	---	---

Solução estoque (SE): obtidas a partir da transferência de 2 mL da SM para BV 25 mL, completando o volume com FM.

Soluções finais: transferiu-se a SE para uma bureta de 10 mL e retirou-se as alíquotas indicadas na Tabela 11 para BV 20 mL, completando o volume com FM.

TABELA 11. Preparação das soluções para a realização da exatidão do método analítico por CLAE-UV, para MPV, através do ensaio de recuperação.

Amostra	Volume de SE (mL)
50% (A,B,C)	1,0
75% (A,B,C)	1,5
100% (A,B,C)	2,0
125% (A,B,C)	2,5
150% (A,B,C)	3,0
100% (Padrão1)	2,0
100% (Padrão2)	2,0

As recuperações de neral e geranial no teste de exatidão foram calculadas com as seguintes equações (Origem das equações em Anexo):

$$R_{neral} = \frac{A_a \times 2}{A_p \times V_{SE}} \times 100\% \quad \textbf{Equação 7}$$

Onde: R_{neral} = recuperação porcentual do neral; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; V_{SE} = volume de solução estoque de citral adicionado.

$$R_{geranial} = \frac{A_a \times 2}{A_p \times V_{SE}} \times 100\% \quad \textbf{Equação 8}$$

Onde: $R_{geranial}$ = recuperação porcentual de geranial; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; V_{SE} = volume de solução estoque de citral adicionado.

4.5.6.1. Resultados e discussão

Os resultados do estudo de exatidão, realizado através do método de recuperação, estão descritos na Tabela 12.

TABELA 12. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de neral e geranial por CLAE-UV para o óleo de *C. citratus*.*

Amostra	Neral		Geranial	
	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR
50%[a]	99,4%	3,8%	99,4%	3,6%
75%[a]	100,0%	2,7%	100,0%	2,6%
100%[a]	98,7%	1,5%	98,9%	1,5%
125%[a]	98,6%	1,0%	98,9%	1,1%
150%[a]	96,9%	0,7%	97,4%	0,6%
Média[b]	**98,7%**	2,2%	**98,9%**	2,0%

[a] n = 3; [b] n = 15.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados no Anexo.

As porcentagens médias de recuperação encontradas no estudo de exatidão (Tabela 12) apresentaram valores de 98,7% para o neral e 98,9% para o geranial, demonstrando a exatidão do método proposto.

4.5.7. Robustez

A robustez do método foi avaliada através de variações deliberadas nos fatores considerados críticos para quantificação dos isômeros do citral – pH da fase móvel, composição da fase orgânica, temperatura do forno, coluna, fluxo e comprimento de onda. Os fatores e níveis estudados para a realização do estudo de robustez estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13. Fatores e níveis estudados para a realização do ensaio de robustez por CLAE-UV para MPV.

Fatores	Nominal	Limites	Nível Estudado (-)	Nível estudado (+)
pH	6,0	1,0	5,0	7,0
Fase Orgânica (%)	60	2,0	58	62
Temperatura do forno (°C)	30	2,0	28	32
Coluna	Acer	---	Acer	Hypersil
Fluxo (mL/min)	1,2	0,05	1,15	1,25
Comprimento onda (nm)	240	2,0	238	242

A FM do método proposto é composta por três solventes e a alteração de um deles causa, necessariamente, a variação dos outros dois. Assim, pode-se verificar que o fator "solvente" não é independente, pois variando a concentração de acetonitrila deve-se variar a concentração de metanol e da água. Esta situação inviabiliza o emprego do ensaio de Placket-Burman e por este motivo optou-se por juntar os solventes orgânicos em um fator – fase orgânica. Após serem definidos os limites de 2,0% para fase orgânica, optou-se por variar 1,5% para acetonitrila e 0,5% para o metanol, devido às diferentes concentrações destes solventes na fase móvel.

Os fatores foram avaliados utilizando desenho fatorial fracionado – Placket-Burman – para 11 fatores e 12 experimentos. Foram incluídos 5 fatores "*dummy*" para completar o experimento que também podem ser utilizados para estimar o erro do experimento, conforme descrito por HEYDEN e colaboradores (2001).

A Tabela 14 contém a sequência de experimentos, nos níveis especificados, que foram realizados para determinação do efeito dos fatores em teste.

TABELA 14. Desenho experimental de Plackett-Burman selecionado para verificação da robustez do método analítico por CLAE-UV para MPV.

Exp	Col	D1	FO	Temp	D2	D3	D4	pH	Fluxo	l	D5
1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
3	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
10	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
11	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Legenda: Col = coluna; D1-5 = *dummy* 1-5; FO = fase orgânica; Temp = temperatua do forno; λ = comprimento de onda.

As amostras de padrão e óleo de *C. citratus* analisadas foram preparadas como no item 4.5.4 – Precisão, preparando-se uma solução de cada amostra, e para cada experimento ambas amostras foram injetadas. As porcentagens de neral e geranial encontradas foram calculadas empregando as equações 5 e 6, respectivamente.

Os efeitos dos fatores foram calculados da seguinte forma:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2} \qquad \textbf{Equação 9}$$

Onde: E_x é o efeito do fator em análise; $\Sigma Y(+)$ e $\Sigma Y(-)$ são a soma das respostas onde x está nos níveis extremos (+) e (-), respectivamente; e N é o número de experimentos do desenho experimental.

A razão entre o efeito e a média dos resultados do ensaio de robustez, para determinação do neral e geranial, foi utilizada para avaliar a influência de um fator específico sobre a quantificação dos analitos (Equação 10). Os valores de DPR determinados na precisão intermediária foram utilizados para comparação e determinação da influência dos fatores.

$$\left|E_{\%}\right| = \frac{E_x}{\%_y} \times 100\% \quad \textbf{Equação 10}$$

Onde: $E_{\%}$ = Efeito porcentual relativo do fator em análise, para neral ou geranial; E_x = Efeito do fator x; $\%_y$ = porcentagem de neral ou geranial encontrado no ensaio de robustez.

4.5.7.1. Resultados e discussão

A Tabela 15 apresenta os resultados do ensaio de robustez empregando o desenho experimental fracionado de Placket-Burman.

TABELA 15. Resultados referentes às porcentagens de neral e geranial, obtidas em cada experimento, do ensaio de robustez para MPV*.

Exp	% Neral	% Geranial
1	32,48	42,86
2	32,40	42,94
3	32,58	42,95
4	32,50	43,01
5	32,38	42,94
6	32,42	42,90
7	32,52	42,81
8	32,62	42,84
9	32,52	42,77
10	32,11	42,85
11	32,52	42,85
12	32,47	42,91
Média (%)	**32,46**	**42,89**
DPR (%)	**0,40**	**0,16**

* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

A Tabela 16 apresenta os efeitos dos fatores em análise e o valor do efeito porcentual relativo.

TABELA 16. Resultados dos efeitos e do efeito porcentual relativo para os fatores em análise no estudo da robustez por CLAE-UV para MPV.

Fatores	Neral		Geranial	
	Efeito (%)	**$E_{\%}$**	**Efeito (%)**	$E_{\%}$
pH	-0,018	0,1	0,026	0,1
Fase Orgânica (%)	-0,081	0,2	-0,003	0,0
Temp. forno (°C)	-0,050	0,2	0,034	0,1
Coluna	0,162	0,5	-0,077	0,2
Fluxo (mL/min)	0,066	0,2	-0,003	0,0
Comp. onda (nm)	-0,108	0,3	-0,062	0,1

$E_{\%}$ = Efeito porcentual relativo.

O fator coluna apresentou maior efeito para quantificação do neral e geranial entre os fatores avaliados. Porém os efeitos porcentuais, que indicam quanto o fator influenciou a quantificação do analito, foram inferiores às variações determinadas no estudo de precisão (neral = 2,7%; geranial = 2,8%) e, por isso, o método foi considerado robusto para quantificação do neral e geranial.

A adequabilidade do sistema cromatográfico é importante durante o uso do método na rotina e na obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. A Tabela 17 apresenta os resultados extremos encontrados no teste de robustez para alguns parâmetros cromatográficos. Para determinação dos fatores que tiveram influência significativa nos parâmetros cromatográficos, usou-se o teste *t-Student*, com a seguinte equação:

$$t = \frac{E_x}{E_e} \qquad \textbf{Equação 11}$$

Onde: E_x é o efeito do fator em análise; E_e = erro experimental.

O erro do experimento foi estimado a partir dos fatores *dummy* e calculado com a equação a seguir:

$$E_e = \sqrt{\frac{? \; E^2_{dummy}}{n_{dummy}}} \qquad \textbf{Equação 12}$$

Onde: E_e = erro experimental; ΣE^2_{dummy} é a soma quadrada dos n_{dummy} efeitos *dummy*; n_{dummy} = número de fatores *dummy* empregados no ensaio.

TABELA 17. Relação dos resultados extremos encontrados para os parâmetros cromatográficos no estudo de robustez da MPV.

Parâmetros cromatográficos	Neral	Geranial	Fatores (níveis) que levam aos casos extremos
Resolução (menor resultado)	2,164		Coluna (+); Fase orgânica (+); Temperatura do forno (+); Fluxo (+)
Assimetria (maior resultado)	1,214	1,197	Coluna (+); Fase Orgânica (+)*
Eficiência da coluna (menor resultado)	17074	17038	Coluna (+); Fluxo (+)
Fator capacidade (menor resultado)	2,74	3,02	Coluna (-); Fase orgânica (+); temperatura do forno (+); pH (-); fluxo (+)

* fator e nível significativo somente para o pico do neral. No restante dos fatores verificou-se influência para ambos os picos (neral e geranial).

A análise da Tabela 17 permite verificar que o sistema cromatográfico é adequado, pois mesmo os valores extremos encontram-se de acordo com os valores preconizados pela literatura (CDER, 1994; SHABIR, 2003). Em relação aos fatores, pode-se verificar, por exemplo, que a eficiência da coluna foi menor com a coluna Hypersil (+) e fluxo aumentado (+). A influência dos outros fatores nos parâmetros cromatográficos pode ser interpretada de maneira similar. Deve-se notar que o fator coluna foi significativa em todos os parâmetros, demonstrando assim, que a escolha e verificação dos parâmetros cromatográficos para uma determinada coluna são fundamentais para ter-se um bom método analítico.

Os valores dos parâmetros cromatográficos presentes na Tabela 17 devem ser considerados como limites durante o uso do método na rotina (adequabilidade do sistema). Este cuidado garante que os resultados obtidos em uma análise posterior estejam de acordo com as condições em que o método foi validado.

4.5.8. Comparação dos métodos CLAE-UV e CG-DIC

Os teores de neral e geranial encontrados na amostra do óleo de *C. citratus* pelo método de CLAE-UV, foram de 32,9% e 43,8%, respectivamente. Estes resultados foram comparados com os valores encontrados pelo método de CG-DIC e não se verificou diferença significativa (para α = 0,05), pelo teste *t-student*, entre os teores de neral e geranial encontrados pelos diferentes métodos (Tabela 18).

Tabela 18. Comparativo entre os métodos de CLAE-UV e CG-DIC.

	Neral		Geranial
Teor médio CLAE	32,9%		43,8%
Teor CG	33,5%		44,6%
$t_{(0,05;\ 20)}$		2,085	
Desvio padrão	0,9%		1,2%
T calç	-1,464		-1,385
Valor de probabilidade	**0,158**		**0,181**

4.6. Conclusões

A amostra do óleo de *C. citratus* adquirida comercialmente apresentou teor de citral de 78,1% (análise por CG), dentro dos valores estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (2003) – teor de citral > 60%.

Na avaliação da atividade antifúngica do óleo de *C. citratus* e do citral, ambos apresentaram atividade frente a *C. albicans* ATCC 10231, demonstrando a importância deste componente na atividade antifúngica apresentada pelo óleo, o que corrobora com os relatos existentes na literatura.

Os resultados satisfatórios para os parâmetros de desempenho analítico (especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez) validam o método proposto por CLAE-UV para quantificação dos isômeros neral e geranial separadamente e, consequentemente, do citral.

Os métodos por CLAE-UV e CG-DIC não apresentaram diferença significativa na determinação dos teores de neral e geranial no óleo de *C. citratus*, demonstrando que o método por CLAE-UV pode ser considerado como uma técnica alternativa ao método farmacopéico por CG-DIC.

5. CAPÍTULO II – PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

5.1. Introdução

Diversos estudos relataram o comportamento do óleo de *C. citratus* frente a condições adversas, demonstrando sua instabilidade e suscetibilidade à degradação, principalmente no que diz respeito à redução do teor de citral, o componente majoritário ao qual se atribui sua atividade. Dessa forma, o emprego deste composto volátil como produto farmacêutico implica cuidados relacionados à sua estabilidade.

Com este intuito, o presente trabalho objetivou promover a proteção do óleo de *C. citratus* através da preparação de micropartículas contendo tal substância, de forma que os componentes que possam vir a interferir na sua estabilidade sejam devidamente protegidos dos processos de degradação.

A obtenção das micropartículas envolveu a avaliação de duas técnicas de preparação, a precipitação (PR) e a secagem por aspersão (SA) e a escolha entre diferentes materiais encapsulantes, ß-ciclodextrina (ß-CD) e hidroxipropil-ß-ciclodextrina (HP-ß-CD). As micropartículas foram caracterizadas e, para a determinação quantitativa de neral e geranial presentes nas mesmas, foi adequado método analítico empregado para MPV por CLAE-UV (Capítulo I).

5.2. Parte experimental

- *Spray-drying* MSD® (Labmaq do Brasil LTDA)
- Aparelho de Karl Fischer Schott (modelo tritoline Alpha)
- Metalizador 4B SVG-IN (Jeol Jee)
- Microscópio eletrônico de varredura JSM-6060 (Jeol Scanning Micropore)

- Lauril Sulfato de Sódio (LSS) 0,5%: pesou-se 5,0 g de LSS e dissolveu-se com aproximadamente 300 mL de água a 50 ºC. Completou-se o volume a 1,0 L com água.

- HP-ß-CD – Roquette, Lote 729771, com teor de pureza de 99%

- ß-CD – Fluka, Lote 32906166, com teor de pureza de 99%

5.3. Preparação das micropartículas

As micropartículas contendo o óleo de *C. citratus* foram preparadas por meio de duas técnicas: PR e SA. Os materiais encapsulantes escolhidos para a otimização da preparação das micropartículas foram a ß-CD e a HP-ß-CD. As proporções de materiais encapsulantes foram avaliadas experimentalmente, assim como as condições de preparação empregadas. As amostras foram preparadas da seguinte forma:

Preparação das amostras utilizando a técnica de precipitação (PR):

- *MβCDOPR* (Micropartículas de β–CD + óleo obtidas por PR): Preparou-se uma solução a 10% de ß-CD (11 g em 110 mL de mistura etanol: água (2:1, p/v) a 55 ºC) e uma solução a 10% de óleo de *C. citratus* em etanol (1,5 mL de óleo e 13,5 mL de etanol). A solução de óleo foi adicionada vagarosamente sobre a solução de ß-CD (55 ºC), sendo agitada constantemente por 4 h enquanto arrefecia. A mistura foi mantida por 16 h a 4ºC e o precipitado formado foi recuperado por filtração (Membrana de nylon 0,45 µm e 47 mm diâmetro, Milipore Milex®) à vácuo. O filtrado foi seco em estufa a 50 ºC por 24 h.

O pó obtido foi acondicionado em frasco âmbar, hermeticamente fechado e mantido em dessecador.

Preparo das amostras utilizando a técnica de secagem por aspersão (SA):

- *MßCDOSA* (Micropartículas de ß-CD + óleo obtidas por SA): Preparou-se uma solução a 10% de ß-CD (11 g em 110 mL de mistura etanol: água (2:1, p/v) a 55 ºC) e uma solução a 10% de óleo de *C. citratus* em etanol (1,5 mL de óleo e 13,5 mL de etanol). A solução de óleo foi adicionada vagarosamente sobre a solução de ß-CD (55 ºC), sendo agitada constantemente por 4 h enquanto arrefecia. Esta amostra foi preparada em duplicata, com a finalidade de realizar diferentes condições experimentais de secagem.

- *MHPßCDOSA* (Micropartículas de HP-ß-CD + óleo obtidas por SA): Preparou-se uma solução a 10% de HP-ß-CD (11 g em 110 mL de mistura etanol: água (2:1) a 55 ºC) e uma solução a 10% de óleo de *C. citratus* em etanol (1,5 mL de óleo e 13,5 mL de etanol). A solução de óleo foi adicionada vagarosamente sobre a solução de HP-ß-CD (55 ºC), sendo agitada constantemente por 4 h enquanto arrefecia. Esta amostra foi, também, preparada em duplicata.

Sob aquecimento (55 ºC), as amostras MßCDOSA e MHPßCDOSA foram secas pelo método de SA, nas condições operacionais descritas na Tabela 19.

TABELA 19. Condições operacionais utilizadas na técnica de SA.

Parâmetros	Condição
Fluxo de alimentação	0,3 L/h
Fluxo de ar	500 NL/h
Pressão de ar comprimido	4 Kgf/cm^2
Temperatura de entrada do ar de secagem	120 ºC/ 150 ºC
Temperatura de saída do ar de secagem	78 ºC/ 90 ºC
Capa de fluido (diâmetro do bico atomizador)	1,2 mm

Na SA, foram avaliadas as temperaturas de entrada de 120 ºC e 150 ºC e mantidos os demais parâmetros, a fim de verificar se existem diferenças marcantes de rendimento e retenção do óleo para diferentes temperaturas. Segundo BECK (2005), variações nos parâmetros da SA, principalmente a temperatura de entrada e fluxo, promovem diferentes resultados para os pós microencapsulados.

Os pós obtidos foram nomeados MßCDOSA120, MßCDOSA150, MHPßCDOSA120 e MHPßCDOSA150 e acondicionados em frascos âmbar, hermeticamente fechados e armazenados em dessecador.

5.4. Caracterização das micropartículas

As micropartículas foram analisadas visualmente e caracterizadas em relação ao teor de umidade, rendimento, porcentagem de inclusão, espectrofotometria na região do IV e a morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.4.1. Teor de umidade e determinação do rendimento e inclusão do óleo nas micropartículas

As micropartículas obtidas foram submetidas à avaliação do teor de umidade pelo método de Karl Fischer, segundo a Farmacopéia Brasileira (1988).

O rendimento foi calculado em porcentagem, através da razão entre a massa total do pó obtido no processo dividido pela massa do produto antes do processo (mCD + massa de óleo incorporado). O rendimento foi determinado para as amostras obtidas através dos dois processos de secagem: a PR e a SA.

A porcentagem de inclusão de óleo foi determinada a partir da análise por CLAE-UV e determinação da quantidade de citral nas micropartículas. A

porcentagem de inclusão do citral nas micropartículas foi calculado como segue (Origem das equações em Anexo):

$$\%_{inclusão} = \frac{q_{exp}}{q_{teórica}} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 13}$$

Onde: $\%_{inclusão}$ = porcentagem de inclusão do citral nas ciclodextrinas; q_{exp} = quantidade de citral nas micropartículas determinado por CLAE-UV; $q_{teórico}$ = quantidade teórica de citral para se ter razão de 1:1 com a ciclodextrina.

5.4.1.1. Resultados e discussão – caracterização das micropartículas

As amostras MßCDOPR, MHPßCDOPR, MßCDOSA120, MßCDOSA150, MHPßCDOSA120 e MHPßCDOSA150 compreenderam pós brancos, com odor característico do óleo, embora menos pronunciado que o da matéria-prima.

Os resultados obtidos na determinação do teor de umidade das micropartículas estão descritos na Tabela 20.

TABELA 20. Resultados obtidos na determinação do teor de umidade das micropartículas.

Amostra	Teor de umidade (%)
MβCDOPR	9,10
MßCDOSA120	9,24
MßCDOSA150	8,84
MHPßCDOSA120	8,53
MHPßCDOSA150	8,60

Os teores de umidade obtidos apresentaram valores inferiores a 10%, dentro dos máximos permitidos para a matéria-prima ß-CD (< 14%) (USP 31, 2008).

Os resultados obtidos na avaliação do rendimento das micropartículas estão descritos na Tabela 21.

TABELA 21. Resultados obtidos para o rendimento das micropartículas.

Amostra	Rendimento (%)
MβCDOPR	81
MßCDOSA120	33
MßCDOSA150	32
MHPßCDOSA120	28
MHPßCDOSA150	27

O rendimento de 81% apresentado pela amostra MβCDOPR foi superior aos valores encontrados para as amostras preparadas pela técnica de SA, provavelmente em virtude das perdas neste processo serem minimizadas. Além disso, os resultados obtidos estão de acordo com BHANDARI e colaboradores (1998), que obtiveram rendimentos entre 80 e 90% para micropartículas de β–CD contendo óleo de limão.

Para as micropartículas preparadas pela técnica de SA, os resultados de rendimento obtidos para as amostras contendo β–CD e HP-β–CD foram semelhantes (33 e 32% de rendimento para β–CD e 28 e 27% para HP-β–CD).

Em relação às diferentes temperaturas de entrada utilizadas na SA, os rendimentos obtidos foram semelhantes para as temperaturas de 120 ºC e 150 ºC. Para as micropartículas preparadas com β–CD, os rendimentos foram de 33% e 32%, para as temperaturas de 120 ºC e 150 ºC, respectivamente. Para as micropartículas preparadas com HP-β–CD, os rendimentos foram de 28% e 27%, para as temperaturas de 120 ºC e 150 ºC, respectivamente. Estes resultados demonstram não haver diferença entre usar a temperatura de 120 ºC ou de 150 ºC no preparo das amostras pela técnica de SA.

ROSENBERGER e colaboradores (1990) obtiveram resultados semelhantes para micropartículas preparadas adicionando-se 10 a 20% de óleo, não observando diferença significativa entre as amostras preparadas com temperatura de entrada de 120 ou 150 ºC. Em contrapartida, acréscimos na temperatura de entrada favoreceram o rendimento de micropartículas quando estas foram preparadas adicionando-se 30% de óleo. Como as amostras

desenvolvidas para o presente estudo foram preparadas sempre com 10% de óleo, o parâmetro temperatura de entrada utilizado na SA foi considerado não significativo no que diz respeito ao rendimento e porcentagem de inclusão de óleo nas micropartículas. Por esta razão, para as amostras preparadas através da SA, passou-se a utilizar apenas a temperatura de entrada de 120 ºC.

Os resultados obtidos na avaliação da porcentagem de inclusão do óleo nas micropartículas estão descritos na Tabela 22.

TABELA 22. Resultados obtidos para a inclusão do óleo nas micropartículas.

Amostra	% inclusão
MßCDOPR	57,2
MßCDOSA120	56,3
MßCDOSA150	60,0
MHPßCDOSA120	29,0
MHPßCDOSA150	26,9

Os resultados obtidos demonstram que a inclusão do óleo foi satisfatória, sendo favorecida utilizando-se a ß-CD (inclusão > 50%) em relação a HP-ßC (inclusão < 30%), sugerindo a superioridade da ß-CD como material encapsulante. BHANDARI e colaboradores (1998) obtiveram porcentagens de inclusão de até 70%, na inclusão de óleos voláteis utilizando ß-CD, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo. Além disso, dentre as amostras preparadas através da SA, utilizando-se a temperatura de entrada de 120 ºC ou 150 ºC, mais uma vez não foram observadas diferenças na inclusão do óleo (56,3 e 60,0% de inclusão para β–CD e 29,0 e 26,9% para HP-β–CD).

A partir dos resultados obtidos para teor de umidade, rendimento e porcentagem de inclusão, a ß-CD mostrou-se como o material encapsulante mais adequando para a preparação das micropartículas. Além disso, para as amostras preparadas pela técnica de SA, diferentes temperaturas de entrada não mostraram ser significativas na preparação das micropartículas. Por essa razão, a amostra MßCDOSA120 foi renomeada MßCDOSA. Por fim, as

amostras que se mostraram mais favoráveis à proteção do óleo de *C. citratus* foram MßCDOPR e MßCDOSA, as quais foram utilizadas na continuação dos experimentos.

5.4.2. Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A técnica de IV foi empregada como método de caracterização das micropartículas contendo óleo de *C. citratus*. Para tanto, foram preparadas pastilhas contendo 1,5 mg da amostra e 150 mg de brometo de potássio (KBr). As amostras analisadas foram MßCDOPR (Micropartículas de ß-CD+óleo obtidas por precipitação) e MßCDOSA (Micropartículas de ß-CD+óleo obtidas por SA).

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR PerkinElmer, modelo BX, gerenciado pelo programa spectrum GX versão 5.3.1. As condições de aquisição empregaram: faixa de 4000 – 400 cm^{-1}, resolução de 4,0 cm^{-1}, intervalo de 2,0 cm^{-1}, acumulação de 40 espectros, sendo os espectros suavizados pelo função “autosmooth” do software.

5.4.2.1. Resultados e discussão - IV

A Figura 10a apresenta o espectro de IV da amostra MßCDOPR, que apresenta perfil idêntico ao da amostra MßCDOSA e é muito semelhante ao espectro da β–CD. A Figura 10b apresenta o espectro de IV do citral, para efeitos comparativos, o qual foi obtido do banco de dados do *National Institute of Standards and Technology* - NIST. O espectro do citral foi obtido de solução a 10% em tetracloreto de carbono para 4000-1330 cm^{-1} e 10% em Sulfeto de carbono para 1330-600 cm^{-1}(NIST, 2008).

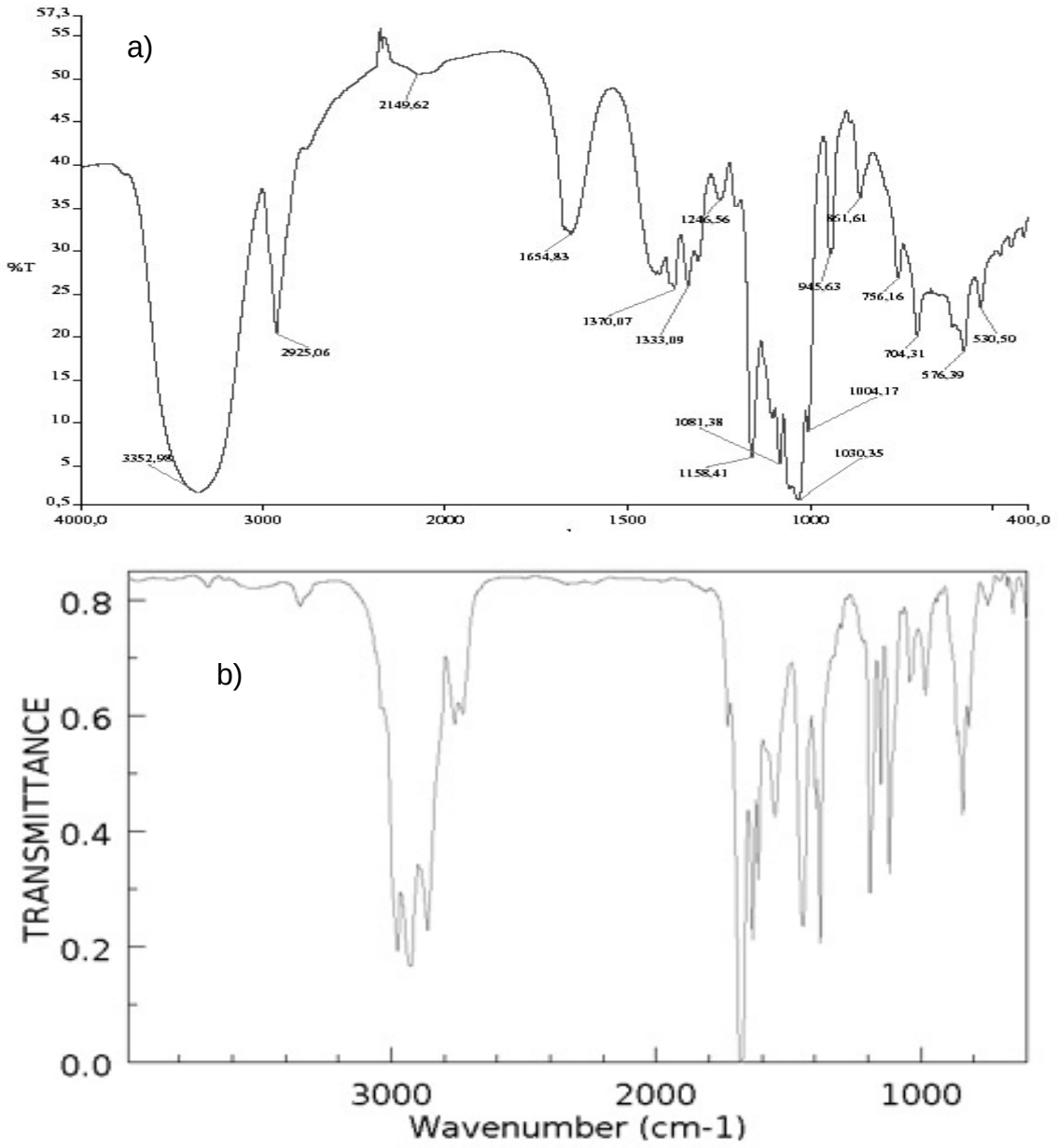


Figura 10. Espectros de IV. a) Amostra MßCDOPR; b) Citral.

Pequenas alterações no espectro dos complexos, em relação ao espectro da β–CD, foram verificadas na região de impressão digital (Figura 11) e estão sintetizadas na Tabela 23.

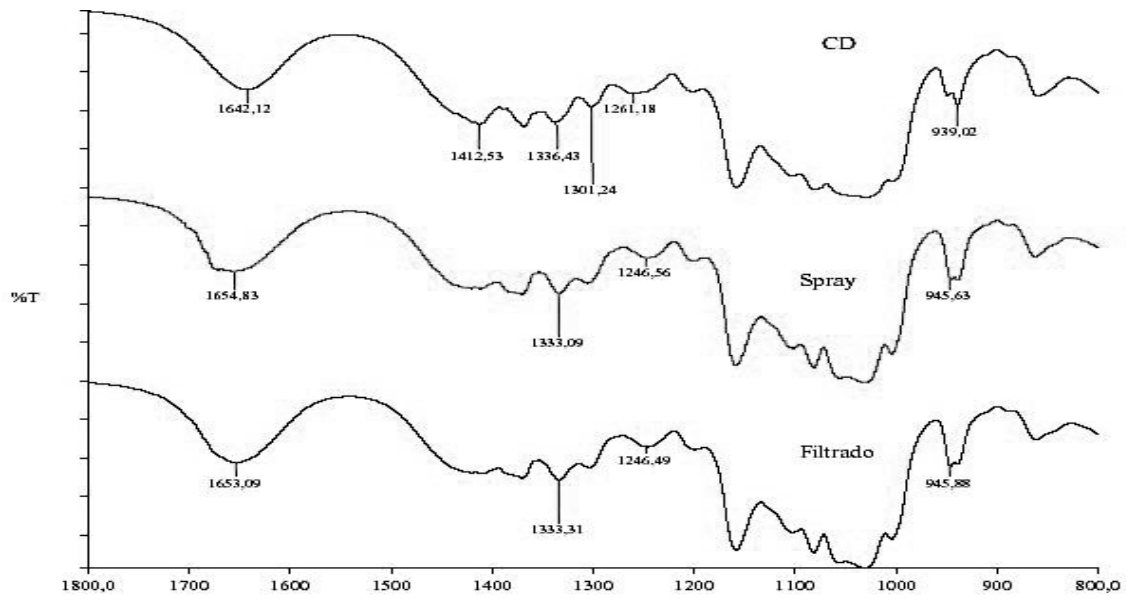


FIGURA 11. Comparação dos espectros de IV da ß-CD ("CD"), MßCDOPR ("Filtrado") e MßCDOSA ("Spray").

TABELA 23. Comparação dos espectros de IV da ß-CD ("CD") e amostras MßCDOPR e MßCDOSA.

b - CD (cm^{-1})	MbCDOPR (cm^{-1})	MßCDOSA (cm^{-1})	Observação
1642,1	1653,1	1654,8	Deslocamento de aproximadamente 10 cm^{-1} para os complexos
939,0	945,9	945,6	Complexos 1 e 2: dois picos de intensidades semelhantes, na região de 940, com maior absorção para o pico em 945 cm^{-1}; β-CD: dois picos de intensidades diferentes, na região de 940, com maior absorção para o pico em 939 cm^{-1}.

Apesar de sutis, as diferenças nos espectros de IV das amostras MßCDOPR e MßCDOSA em relação ao da β–CD, permitem identificar amostras de micropartículas de β–CD contendo óleo, através da verificação de absorção na região de 1654 cm^{-1} e presença de dois picos de intensidade semelhante na região de 940 cm^{-1}.

5.4.3. Análise morfológica das micropartículas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A análise da morfológica dos pós foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (Jeol Scanning, JSM-6060). As amostras de ß-CD (matéria-prima), MßCDOPR e MßCDOSA foram previamente metalizadas com platina (Balzers Sputter Coater Modelo SCD 050) e as fotomicrografias foram obtidas utilizando-se uma voltagem de 5 Kv e aumentos entre 500 a 3500 vezes. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

5.4.3.1. Resultados e discussão - MEV

A análise através de MEV demonstrou diferenças entre as partículas obtidas por SA e por PR, observados em aumento de 1000 x, como mostra a Figura 12.

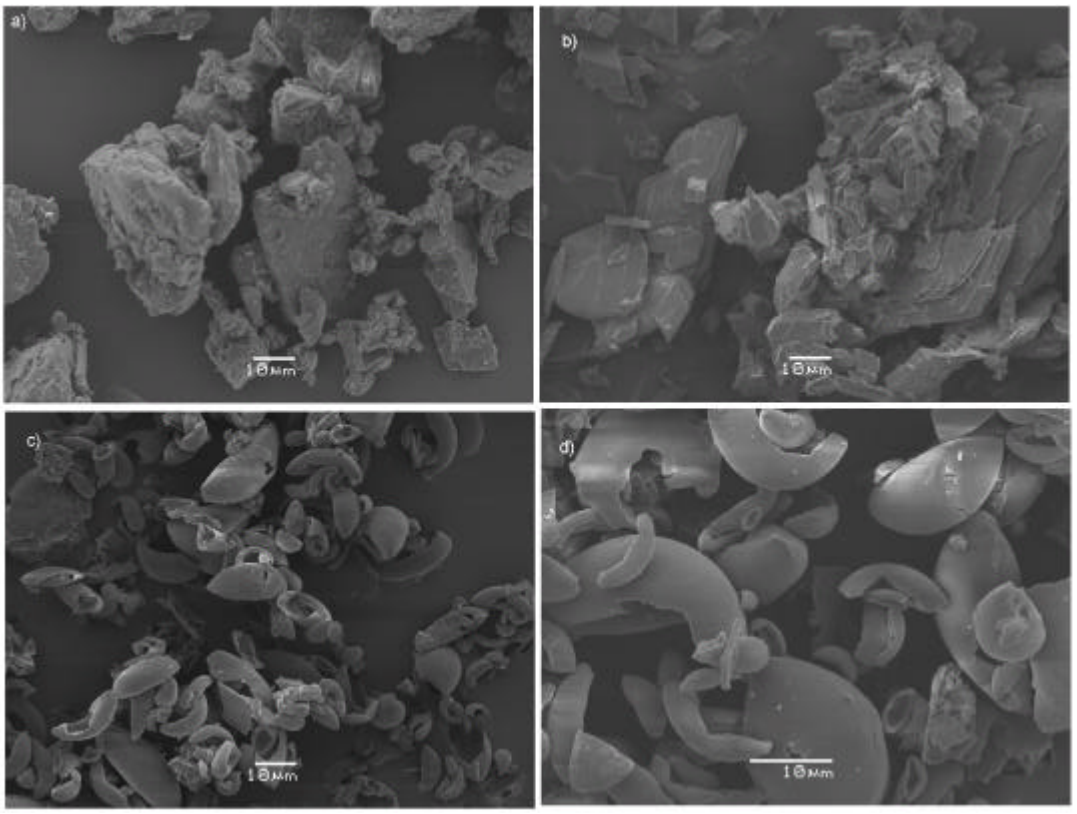


Figura 12. Fotomicrografias das micropartículas de ß-CD (a), MßCDOPR (b) e MßCDOSA (c) em magnitude de 1000X e MßCDOSA (d) em magnitude de 2000X.

Na amostra da matéria-prima ß-CD (a) observou-se a presença de cristais irregulares, com distribuição de tamanhos variados e aparentemente similares entre si; essa amostra foi analisada com a finalidade de ter um parâmetro em relação às amostras MßCDOPR e MßCDOSA.

Na técnica de SA, comumente se obtêm partículas de forma esférica e com superfície lisa. A amostra de MßCDOSA (c) e (d) apresentou partículas esféricas rompidas, com distribuição de tamanho variável e aparentemente similares entre si. Fluxo, temperatura de entrada e saída, concentração do sólido e características intrínsecas dos componentes da formulação podem ser os responsáveis pela forma observada, que difere do esperado.

Além disso, alguns autores têm feito considerações em relação à formação de partículas com concavidades na SA, forma esta que corresponde ao oposto do que ocorreu neste estudo. Segundo WALTON (2000) que remete à CROSBY e MARSHALL (1958), as concavidades apresentadas pelas partículas na SA são atribuídas à ação da capilaridade da superfície seca no momento da extração do líquido do interior da partícula, que ocorre uniformemente, criando uma pressão interna menor que a atmosférica, resultando em partículas colabadas. No caso da amostra MßCDOSA, como o material do núcleo é constituído de um óleo, as altas temperaturas podem ter gerado uma pressão interna mais alta que a pressão atmosférica, acarretando a saída do óleo como uma “explosão”, o que justificaria a forma rompida das esferas vizualisadas na MEV.

A amostra obtida por PR (b) apresentou cristais de forma irregular, com ampla distribuição de tamanho de partícula e aparentemente similares entre si. Verifica-se, também, semelhança com a morfologia da ß-CD, uma vez que esta é obtida por técnica de cristalização (ROWE *et al*, 2001).

A partir das fotomicrografias da Figura 12, foi feita uma estimativa dos tamanhos das micropartículas, a fim de avaliar a ordem de grandeza das mesmas. Os valores variaram entre 27 µm e 64 µm para a matéria-prima ß-CD, 22 µm e 66 µm para a MßCDOPR e 5,5 µm e 23 µm para a MßCDOSA.

5.4.4. Validação de método analítico por CLAE-UV para determinação quantitativa de neral e geranial presentes nas micropartículas.

O método por CLAE para a determinação quantitativa de neral e geranial presentes nas micropartículas foi adequado a partir do método validado para a quantificação dos isômeros presentes no óleo de *C. citratus*. Os equipamentos, materiais (incluindo a coluna) e as condições cromatográficas estão descritas no Capítulo I (item 4.5.1).

Os parâmetros avaliados foram: especificidade, precisão e exatidão. Para a linearidade e robustez, foram considerados os resultados encontrados para o método validado para o óleo de *C. citratus*.

A amostra de MßCDOPR foi empregada nos ensaios de precisão, exatidão e especificidade.

Durante os ensaios, a FM foi recirculada, com o objetivo de gerar menos resíduo.

5.4.4.1. Especificidade

A especificidade foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos com o diluente contendo β–CD dissolvida. A análise visual comparou os tempos de retenção dos isômeros do citral e dos potenciais interferentes da amostra. Além disso, avaliou-se a pureza dos picos do neral e geranial em cromatograma obtido com a amostra de MβCDOPR.

Para execução do ensaio de especificidade foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução diluente: Transferiu-se 10 mL de LSS 0,5% para BV 25 mL e completou-se o volume com FM. Transferiu-se alíquota de 5 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

- Solução βCD: pesou-se 50 mg de β–CD em BV 25 mL, dissolveu-se com 10 mL de LSS 0,5% e completando-se o volume com FM. Transferiu-se

alíquota de 5 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

- Solução amostra: pesou-se 50 mg do pó de MβCDOPR em BV 25 mL e dissolveu-se com 10 mL de LSS 0,5%, completando-se o volume com FM. Transferiu-se alíquota de 5 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

- Solução padrão: Transferiu-se 10 mL de LSS 0,5% para BV 100 mL e, após, foi realizada a tara da balança. Adicionou-se, então, 80 µL de citral padrão (equivalente a aproximadamente 70 mg) e completou-se o volume com FM (Solução Estoque – SE). Transferiu-se 5 mL da solução Estoque para BV 25 mL e completou-se o volume com FM. Alíquota de 5 mL da solução anterior foi transferida para BV 25 mL e o volume foi -completado com FM.

5.4.4.1.1. Resultados e discussão

A Figura 13 apresenta os cromatogramas sobrepostos das soluções LSS, β–CD, amostra MβCDOPR e citral padrão.

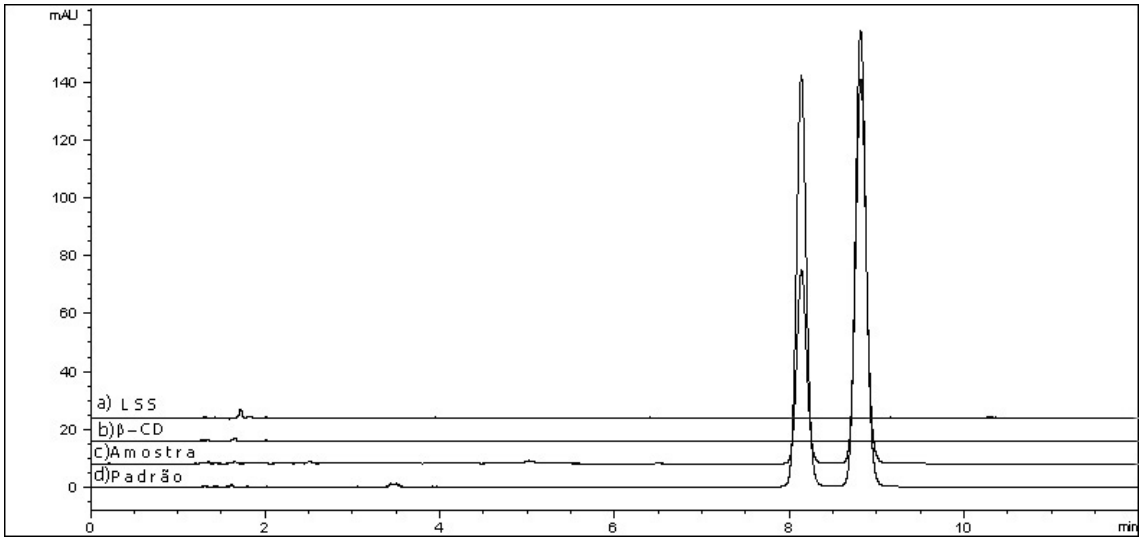


FIGURA 13. Especificidade do método por CLAE-UV (240 nm) para as micropartículas de β-CD contendo óleo de *C. citratus*. a) LSS: solução diluente; b) β-CD: solução de β-CD; c) Amostra: solução das MβCDOPR; d) Padrão: solução de citral padrão.

Não se verificou presença de picos, nos cromatogramas da solução diluente (contendo LSS) e solução β–CD, nos tempos de retenção equivalentes ao neral e geranial. Além disso, a análise da pureza do pico para amostra de MβCDOPR não detectou a presença de impurezas nos picos do neral e geranial (Figura 14). Estes resultados confirmam a especificidade do método por CLAE.

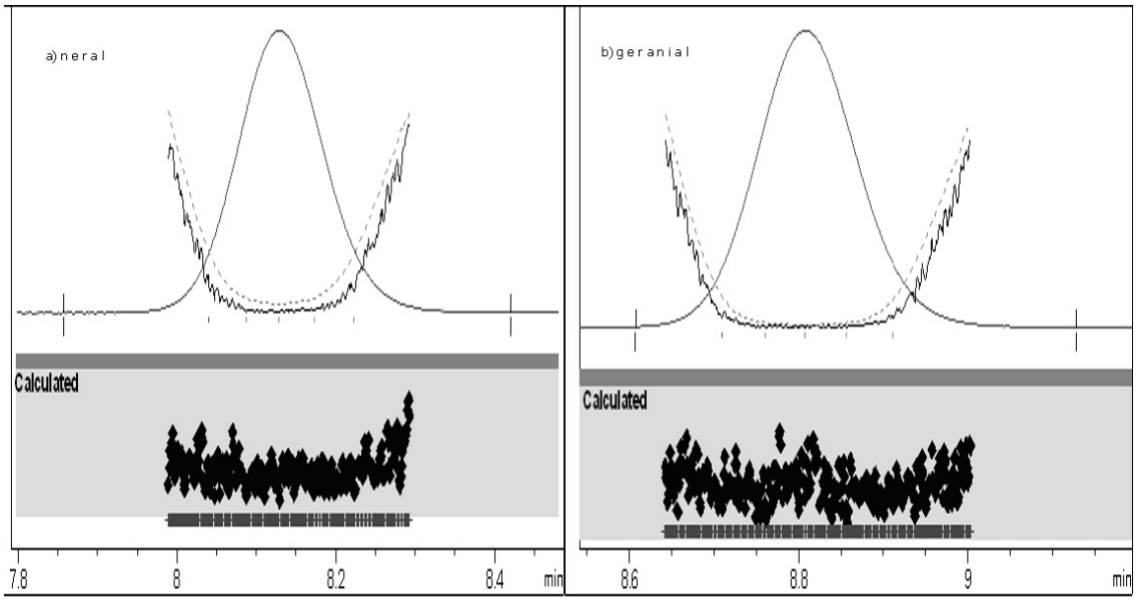


FIGURA 14. Pureza dos picos do neral e geranial na amostra de MβCDOPR.

5.4.4.2. Precisão

A precisão do método analítico foi realizada através da repetibilidade e da precisão intermediária, determinando-se o desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos na quantificação do neral e geranial presentes na amostra de MβCDOPR.

Para o ensaio de repetibilidade foram preparadas seis réplicas da solução amostra e uma solução padrão, conforme descrito a seguir.

- Solução amostra: pesou-se 50 mg do amostra de MβCDOPR em BV 25 mL e dissolveu-se com 10 mL de LSS 0,5%, completando-se o volume com FM.

Desta solução, transferiu-se alíquota de 5 mL para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

- Solução padrão: Transferiu-se 10 mL de LSS 0,5% para BV 100 mL e, após, foi realizada a tara da balança. Adicionou-se 80 µL de citral, anotou-se a massa pesada e completou-se o volume com FM (Solução Estoque – SE). Transferiu-se alíquota de 5 mL da SE para BV 25 mL e completou-se o volume com FM. Transferiu-se, então, alíquota de 5 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

As porcentagens de neral e geranial, na amostra de MβCDOPR, foram calculadas com as seguintes equações (Origem das equações em Anexo):

$$\%_{neral} = \frac{m_p \times T_{Neral} \times A_a}{20 \times A_p \times m_a} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 14}$$

Onde: $\%_{neral}$ = porcentagem de neral na amostra de micropartículas; d_p m_p = massa de citral padrão, em mg; T_{neral} = teor de neral no citral padrão; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; m_a = massa de micropartículas, em mg.

$$\%_{geranial} = \frac{m_p \times T_{Geranial} \times A_a}{20 \times A_p \times m_a} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 15}$$

Onde: $\%_{geranial}$ = porcentagem de geranial na amostra de micropartículas; m_p = massa de citral padrão, em mg; $T_{geranial}$ = teor de geranial no citral padrão; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; m_a = massa de micropartículas, em mg.

A precisão intermediária foi determinada através da análise dos resultados da repetibilidade, realizada por dois analistas, em três dias diferentes.

5.4.4.2.1. Resultados e discussão

A Tabela 24 apresenta os resultados do ensaio de precisão da amostra de MβCDOPR e demonstram a baixa variabilidade obtida entre os resultados de um mesmo dia. Os valores de DPR para repetibilidade e precisão

intermediária foram menores que 2,0% indicando que o método possui precisão para análise do neral, geranial e citral.

TABELA 24. Resultados do ensaio de precisão na determinação de citral (neral e geranial) em amostra de Mb CDOPR*.

Ensaio	Neral		Geranial		Citral	
Repetibilidade	**$\%_{neral}$**	**DPR (%)**	**$\%_{geranial}$**	**DPR (%)**	**$\%_{citral}$**	**DPR (%)**
Analista1/Dia1[a]	2,29	1,07	4,22	1,13	6,51	1,09
Analista2/Dia2 [a]	2,23	1,04	4,17	0,86	6,40	0,91
Analista1/Dia3 [a]	2,30	1,07	4,27	1,18	6,57	1,13
Precisão Intermediária[b]	2,27	1,67	4,22	1,44	6,49	1,50

[a] n = 6; [b] n = 18.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados no Anexo.

Além disso, o geranial apresentou maior facilidade para formação de complexo com a ß-CD, pois a proporção de geranial em relação ao neral é maior nas micropartículas do que na MPV. Nas micropartículas, o geranial representa 65% da quantidade de citral, enquanto que na MPV representa 57%.

5.4.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada através da avaliação da recuperação do citral padrão adicionado a amostras de β–CD. Foram analisadas três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada.

Para preparação das soluções do ensaio de exatidão foram transferidos 10 mL de LSS 0,5% para BV 100 mL, tarou-se a balança analítica, adicionaram-se os volumes de padrão indicados na Tabela 25, anotaram-se os valores pesados e completou-se o volume com FM (SE Citral Padrão).

TABELA 25. Quantidades de citral padrão pesadas para o ensaio de exatidão.

Nível	Volume de padrão (mL)	Massa aproximada (mg)
Baixo*	40	36
Médio*	80	72
Alto*	120	108

* cada nível com três réplicas.

Paralelamente, foram pesados 50 mg de βCD em BV 25 mL e dissolveu-se com 10 mL de LSS 0,5%. Neste mesmo BV adicionou-se 5 mL da SE Citral Padrão e completou-se o volume com FM. Transferiu-se 5 mL da solução anterior (contendo β–CD e citral padrão) para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

A solução citral padrão empregada para cálculo da recuperação de neral e geranial nas amostras em diferentes níveis foi preparada como descrito no item anterior (Precisão).

As recuperações de neral, geranial e citral no ensaio de exatidão foram calculadas com as seguintes equações (Origem das equações em Anexo):

$$R_{neral} = \frac{m_p \times A_a}{m_{px} \times A_p} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 16}$$

Onde: R_{neral} = recuperação porcentual do neral; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; m_{px} = massa de citral padrão empregada na solução amostra.

$$R_{geranial} = \frac{m_p \times A_a}{m_{px} \times A_p} \times 100\% \qquad \textbf{Equação 17}$$

Onde: $R_{geranial}$ = recuperação porcentual de geranial; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; m_{px} = massa de citral padrão empregada na solução amostra

$$R_{citral} = \frac{m_p \times (A_{an} + A_{ag})}{m_{px} \times (A_{pn} + A_{pg})} \times 100\% \quad \textbf{Equação 18}$$

Onde: R_{citral} = recuperação porcentual de citral; A_{an} = área do pico do neral na solução amostra; A_{ag} = área do pico do geranial na solução amostra; A_{pn} = área do pico do neral na solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; A_{pg} = área do pico do geranial solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; m_{px} = massa de citral padrão empregada na solução amostra.

5.4.4.3.1. Resultados e discussão

Os resultados do ensaio de exatidão das micropartículas, realizado através do método de recuperação, estão descritos na Tabela 26.

TABELA 26. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de citral (neral e geranial) por CLAE-UV na amostra de Mb CDOPR*.

	Neral		Geranial		Citral	
Nível	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**
50%[a]	101,2	1,9	101,2	2,0	101,2	2,0
100%[a]	100,0	0,9	100,0	0,9	100,0	0,9
150%[a]	100,7	0,9	100,7	1,0	100,7	1,0
Média[b]	**100,6**	1,3	**100,6**	2,0	**100,6**	1,3

[a] n = 3; [b] n = 9.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

As porcentagens médias de recuperação encontradas no ensaio de exatidão, de 100,6% para neral, geranial e citral, com pequena variação entre os resultados, demonstram a exatidão do método proposto.

5.5. Conclusões

O teor de umidade, rendimento e porcentagem de inclusão determinaram a escolha da ß-CD como o material encapsulante mais

adequado para a preparação das micropartículas. O rendimento apresentado para o método de preparação das micropartículas por PR foi superior ao observado pela técnica de SA.

A técnica de IV mostrou-se adequada para identificar amostras de ß-CD contendo citral microencapsulado. A MEV permitiu avaliar a morfologia das micropartículas, possibilitando a diferenciação entre os métodos de preparação (PR e SA).

O método por CLAE-UV desenvolvido e validado para as micropartículas de ß-CD contendo óleo de *C. citratus*, apresentou especificidade, precisão e exatidão adequadas para quantificação de neral e geranial. A recirculação da FM não causou deterioração da linha de base dos cromatogramas, possibilitando gerar menos resíduo.

Não foi preciso realizar tratamento prévio das amostras a serem analisadas por CLAE-UV, o que se mostra como uma vantagem, uma vez que a técnica de CG exige a extração com solvente orgânico.

O geranial apresentou maior capacidade de inclusão nas β-CD quando comparado com o neral.

6. CAPÍTULO III – FORMULAÇÕES E ESTABILIDADE

6.1. Introdução

Os óleos voláteis têm se mostrado promissores quando incorporados em formulações farmacêuticas (HARRIS, 2002). Dentre os óleos com potencial emprego em formulações, o óleo de *C. citratus* recebe grande atenção face aos resultados descritos na literatura, principalmente no que diz respeito a sua atividade antifúngica. A necessidade de um tratamento alternativo para doenças como candidíases, onicomicoses e dermatomicoses, coloca esta MPV como alternativa a ser empregada no desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

Neste trabalho foram desenvolvidas micropartículas contendo o óleo de *C. citratus*, a fim de protegê-lo da volatilização; dando continuidade, estas micropartículas foram incorporadas em formulações semi-sólidas e estas foram submetidas à temperatura de 40 °C em estufa, a fim de avaliar o comportamento do óleo, em particular dos isômeros neral e geranial, presentes nas diferentes formulações.

Foram preparados géis hidrofílicos (GH) e emulsões não-iônicas (ENI), de acordo com SILVA (2005), utilizando componentes como ceras, óleos e tensoativos não iônicos, em proporções usuais. As amostras foram preparadas e avaliadas quanto às suas propriedades físico-químicas e em relação a sua estabilidade.

6.2. Preparação das amostras

6.2.1. Emulsão não-iônica O/A (ENI)

As emulsões não-iônicas O/A foram preparadas da seguinte forma: os componentes oleosos e hidrossolúveis foram aquecidos à temperatura de 70 ºC, separadamente; após, a fase hidrofílica foi lentamente adicionada à fase lipofílica, sendo emulsificadas em gral de porcelana, seguindo-se homogenização e resfriamento. Foram preparadas duas formulações,

denominadas ENIPR e ENISA, às quais adicionou-se MßCDOPR e MßCDOSA, respectivamente. Os componentes empregados na preparação das ENIs estão descritos na Tabela 27.

TABELA 27. Componentes empregados na preparação das ENIs.

Componentes	ENIPR % (m/v)	ENISA % (m/v)
Álcool cetílico	4,0	4,0
Eumulgim B2®	2,0	2,0
MEG	8,0	8,0
Cetiol V®	5,0	5,0
BHT	0,01	0,01
Germall 115®	0,1	0,1
Propilenoglicol	5,0	5,0
Água q.s.p.	100 mL	100 mL

As formulações foram acondicionadas em frascos plásticos, de parede dupla e tampa rosqueável.

6.2.2. Gel hidrofílico (GH)

Os géis hidrofílicos foram preparados com o polímero Carbopol 940®. Os componentes empregados foram homogeneizados utilizando-se agitador de hélice (Janke e Kunkel; IKA). Foram preparados dois géis, denominados GHPR e GHSA, aos quais adicionou-se MßCDOPR e MßCDOSA, respectivamente. Os componentes empregados na preparação dos GHs estão descritos na Tabela 28.

Tabela 28. Componentes empregados na preparação dos GHs.

Componentes	GHPR (% m/v)	GHSA (% m/v)
Carbopol 940®	1,5	1,5
Trietanolamina	1,5	1,5
Tween 80	0,5	0,5
Germal 115®	0,1	0,1
Água q.s.p.	100 mL	100 mL

Os géis foram acondicionados em frascos plásticos, de parede dupla e tampa rosqueável.

6.3. Adequação de método analítico por CLAE para determinação de neral e geranial em micropartículas incorporadas em ENI e GH.

Para acompanhar a estabilidade das formulações ENI e GH, contendo micropartículas de óleo de *C. citratus*, foi adaptado método por CLAE para doseamento do óleo em micropartículas (Capítulo II). Os parâmetros de desempenho analítico avaliados foram: especificidade, precisão e exatidão. empregando amostras de ENIPR (10%) e GHPR (10%).

As condições cromatográficas empregadas na quantificação do neral e geranial em formulações contendo óleo de *C. citratus* foram: FM constituída de acetonitrila: água: metanol (5:4:1, v/v/v), fluxo de 1,2 mL/min, pré-coluna C18 Phenomenex® (Torrance, CA, USA) (250 mm x 4,6 mm, 4µm), coluna ACE® C18 (25 mm x 4,6 mm, 5 µm) lote A20966, detecção em 240 nm, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 30 ºC, tempo de análise de 10 min.

Para realizar a quantificação de citral (neral e geranial) presente nas formulações, as ENIs e os GHs foram homogeneizados em gral de porcelana e desta mistura foi retirada a alíquota necessária para preparação das

dispersões. A ausência de pré-tratamento das amostras para análise por CLAE-UV favorece a redução do tempo total de análise.

Os reagentes e demais equipamentos empregados nos ensaios a seguir encontram-se descritos no Capítulo I.

6.3.1. Especificidade ENIPR

A especificidade, para a ENI contendo micropartículas, foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos com solução da ENI e solução da ENIPR. A pureza dos picos do neral e geranial, da amostra de ENIPR, foi empregada para detecção de interferentes.

Para execução do teste de especificidade foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução amostra (ENIPR): pesou-se 500 mg de ENIPR em béquer, adicionou-se 0,5 mL de água e com auxílio de espátula homogeneizou-se a amostra. Adicionou-se 0,5 mL de água e homogeneizou-se com cuidado até não se verificar grumos. Adicionou-se 1 mL de LSS 1,0% e homogeneizou-se a amostra. Adicionou-se 18 mL de LSS 1,0%, manteve-se o frasco fechado e agitou-se por 15 min em agitador magnético. Transferiu-se a mistura para BV 50 mL e completou-se o volume com FM. Transferiu-se 10 mL da suspensão anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM. Filtrou-se a solução com papel filtro e, posteriormente, por membrana de 0,45 µm.

- Solução branco (ENI): a solução branco foi preparada de maneira similar a solução amostra pesando-se 500 mg de ENI.

6.3.1.1. Resultados e discussão – especificidade ENIPR

A Figura 15 apresenta os cromatogramas sobrepostos das soluções amostra e branco.

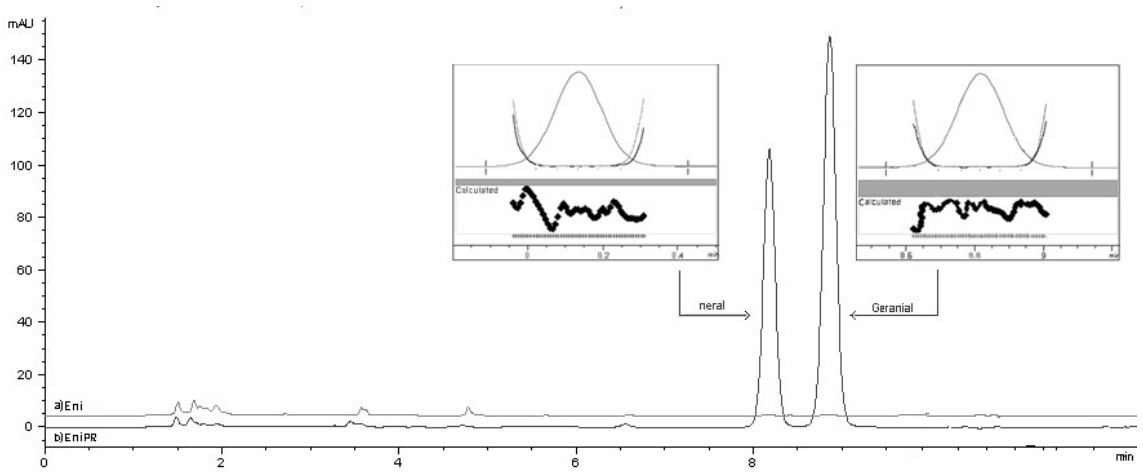


FIGURA 15. Cromatogramas sobrepostos da solução ENI (a) e da solução ENIPR (b). Pureza dos picos do neral e geranial.

A análise visual do cromatograma da solução branco (ENI) não apresentou absorção em 240 nm nos tempos de retenção do neral e geranial. A análise da pureza dos picos dos isômeros não detectou presença de interferentes e os índices de pureza de pico foram maiores que 999 para ambas substâncias. Estes resultados confirmam a especificidade do método.

6.3.2. Precisão ENIPR

A precisão do método analítico foi realizada através da repetibilidade e da precisão intermediária, determinando-se o desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos na quantificação do citral (neral e geranial) presentes na amostra de ENIPR.

Para o ensaio de repetibilidade foram preparadas seis réplicas da solução amostra e uma solução padrão, conforme descrito a seguir.

- Solução amostra: pesou-se 500 mg de ENIPR em béquer, adicionou-se 0,5 mL de água e com auxílio de espátula homogeneizou-se a amostra. Adicionou-se 0,5 mL de água e homogeneizou-se com cuidado até não se verificar grumos. Adicionou-se 1 mL de LSS 1,0% e homogeneizou-se a amostra. Adicionou-se 18 mL de LSS 1,0%, manteve-se o frasco fechado e

agitou-se por 15 min em agitador magnético. Transferiu-se a mistura para BV 50 mL e completou-se o volume com FM. Transferiu-se 10 mL da suspensão anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM. Filtrou-se a solução com papel filtro e, posteriormente, por membrana de 0,45 μm.

- Solução padrão: Transferiu-se 10 mL de LSS 1,0% para BV 100 mL e, após, foi realizada a tara da balança. Adicionou-se 80 μL de citral padrão, anotou-se a massa pesada e completou-se o volume com FM (Solução Estoque – SE). Transferiu-se alíquota de 5 mL da SE para BV 25 mL e completou-se o volume com FM. Transferiu-se, então, alíquota de 5 mL da solução anterior para BV 25 mL e completou-se o volume com FM.

As porcentagens de citral (neral e geranial) na amostra de ENI, foram calculadas empregando as mesmas equações utilizadas na análise das micropartículas de β–CD contendo óleo de *C. citratus* (Equações 14 e 15). Isto foi possível, pois os fatores de diluição do padrão e das amostras foram iguais nas duas determinações (Precisão micropartículas e Precisão ENI).

6.3.2.1. Resultados e discussão – precisão ENIPR

A precisão intermediária foi determinada através da análise dos resultados da repetibilidade, realizada por dois analistas, em dias diferentes.

A Tabela 29 apresenta os resultados do ensaio de precisão da amostra de ENIPR. Os valores de DPR inferiores a 2,0% estão de acordo com os limites encontrados na literatura para análise de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; ERMER, PLOSS, 2005). Além disso, os baixos valores de DPR podem ser associados à ausência de pré-tratamento da amostra, o que é uma vantagem, uma vez que para emulsões, comumente se torna necessária a realização de processos extrativos líquido-líquido e adição de padrão interno para melhorar os resultados de precisão.

TABELA 29. Resultados do ensaio de precisão na determinação de citral (neral e geranial) em amostra de ENI*.

Ensaio	Neral		Geranial		Citral	
Repetibilidade	**$\%_{neral}$**	**DPR (%)**	**$\%_{geranial}$**	**DPR (%)**	**$\%_{citral}$**	**DPR (%)**
Analista1/Dia1[a]	0,272	1,39	0,365	1,57	0,637	1,49
Analista2/Dia2 [a]	0,267	1,15	0,357	1,40	0,624	1,29
Analista1/Dia3[a]	0,271	1,57	0,361	1,26	0,632	1,39
Precisão Intermediária[b]	0,270	1,48	0,361	1,63	0,631	1,55

[a] n = 6; [b] n = 18.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

6.3.3. Exatidão ENIPR

A exatidão do método foi determinada através da avaliação da recuperação das micropartículas de MβCDOPR adicionadas a ENI. Foram analisadas cinco concentrações com duas réplicas cada.

A preparação das amostras para análise empregou as quantidades de micropartículas e ENI descritos na Tabela 30. Os componentes foram misturados e as amostras preparadas como descrito no item anterior (Precisão). A amostra contendo somente micropartículas foi utilizada como padrão.

TABELA 30. Quantidades de MβCDOPR e ENI empregadas no ensaio de exatidão.

Amostra	MβCDOPR (mg)	ENI (mg)
50%[a]	25,0	450
75% [a]	37,5	450
100% [a]	50,0	450
125% [a]	62,5	450
150% [a]	75,0	450
Padrão	50,0	- - -

[a] cada amostra com duas réplicas.

As recuperações de citral (neral e geranial) no ensaio de exatidão foram calculadas com as equações 16 - 18, adaptando as variáveis das equações, considerando-se como amostra as preparações contendo ENI e como padrão a solução de MβCDOPR.

.

6.3.3.1. Resultados e discussão – exatidão ENIPR

Os resultados do ensaio de exatidão para a ENIPR, realizado através do método de recuperação, estão descritos na Tabela 31.

TABELA 31. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de citral (neral e geranial) por CLAE-UV na amostra de ENIPR*.

	Neral		Geranial		Citral	
Amostra	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**
50%[a]	98,5	0,4	99,8	0,5	99,3	0,5
75%	97,6	1,9	97,4	2,0	97,5	2,0
100%[a]	101,6	1,2	101,6	1,8	101,6	1,6
125%	97,8	0,9	97,8	0,7	97,8	0,8
150%[a]	96,4	1,3	96,1	2,1	96,2	1,8
Média[b] [b]	**98,4**	2,1	**98,5**	2,4	**98,5**	2,2

[a] n = 2; [b] n = 10.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

Os valores de recuperação, nos diferentes níveis avaliados, próximos a 100% e recuperação média no intervalo de 98 – 102% confirmam a exatidão do método.

6.3.4. Discussão de parâmetros analíticos para quantificação de neral e geranial em ENIPR

Para análise por CLAE, das amostras de ENIPR, foi alterado o lote da coluna usada na validação da MPV e das MβCDOPR, além da inclusão de

pré-coluna para minimizar a influência dos componentes da ENI na quantificação e vida útil da coluna. Estas alterações no método não causaram mudanças significativas nos parâmetros de adequabilidade do sistema em comparação com os resultados obtidos durante a validação do método para MPV, como pode ser evidenciado na Figura 16 e Tabela 32.

Apesar das alterações realizadas para análise da ENI, os tempos de retenção do neral e geranial foram iguais aos observados durante a validação da MPV. Isto pode ser associado às pressões observadas nos diferentes experimentos (~ 110 bar na MPV e ~ 145 bar no ENIPR).

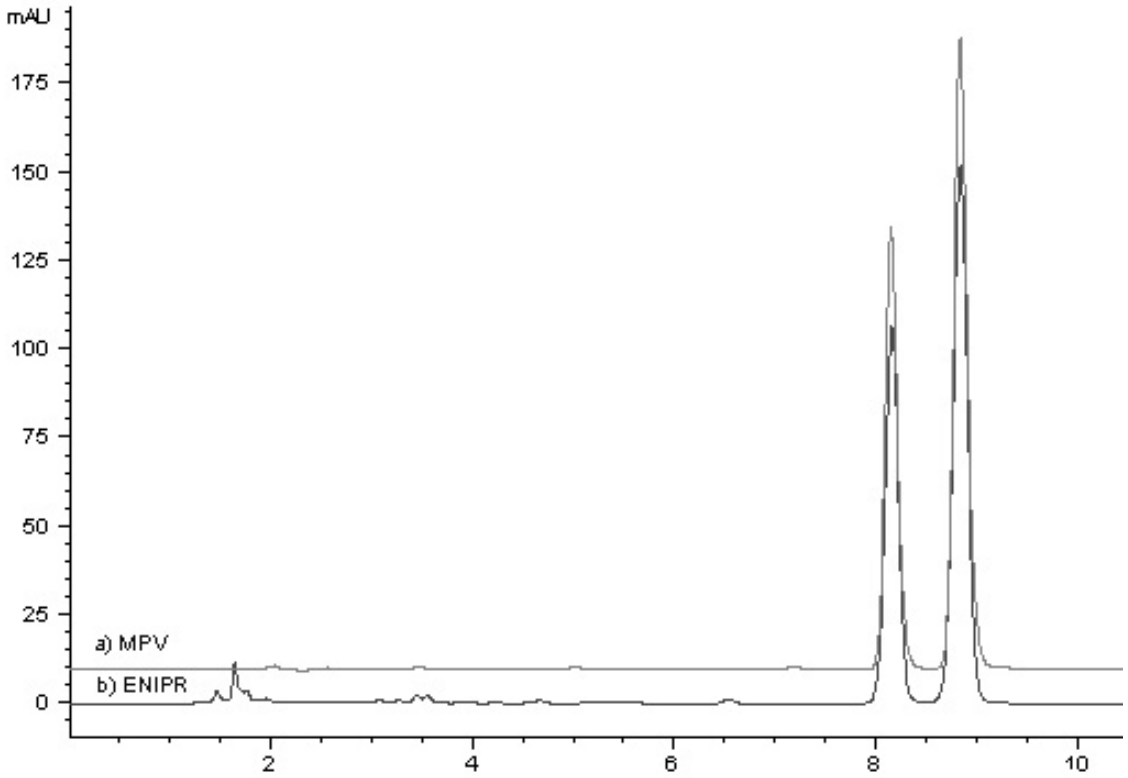


FIGURA 16. Cromatogramas sobrepostos da MPV e ENIPR. a) Cromatograma do primeiro dia de precisão da MPV; b) cromatograma do primeiro dia de precisão da ENIPR.

Tabela 32. Resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema para amostra de MPV empregando a coluna ACE C18 (lote A35880) e para ENIPR empregando pré-coluna e coluna ACE C18 (lote A20966).

	Neral			Geranial		
Parâmetro	**MPV**	**ENIPR**	**AS**	**MPV**	**ENIPR**	**AS**
Fator capacidade (k')	3,08	4,59	>2,74	3,43	5,06	>3,02
Pratos teóricos (N)	20987	17723	>17074	20842	17795	>17038
Assimetria	1,16	1,01	<1,214	1,16	1,00	<1,197
Resolução	2,94	2,67	>2,164			

AS = adequabilidade do sistema determinada no ensaio de robustez da MPV.

Forte correlação entre as massas de MβCDOPR pesadas no teste de exatidão do ENIPR e as áreas dos picos do neral e geranial foram verificadas (Figura 17). Estes resultados demonstram não haver evidência de alteração do comportamento linear do neral e geranial na faixa de concentração estudada devido à inclusão da pré-coluna.

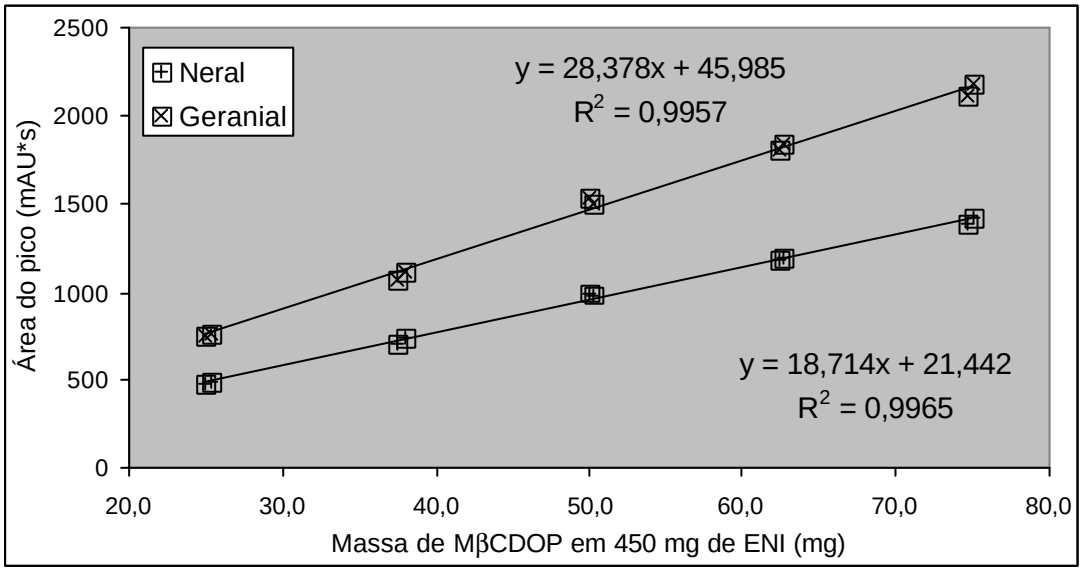


FIGURA 17. Relação das massas de MβCDOPR pesadas no ensaio de exatidão do ENIPR e as áreas dos picos do neral e geranial em 240 nm. Equações da reta e coeficiente de determinação do geranial (superior) e do neral (inferior).

Os resultados de especificidade, precisão e exatidão satisfatórios garantem a confiabilidade dos resultados obtidos para quantificação do citral (neral e geranial) nas amostras de ENI contendo MβCDOPR.

6.3.5. Especificidade GHPR

A especificidade, para o gel hidrofílico contendo óleo de *C. citratus*, foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos com solução do GH e solução do GHPR. A pureza dos picos do neral e geranial, da amostra de GHPR, foi empregada para detecção de interferentes.

As amostras em análise foram preparadas como descrito no item *Especifidade ENI*, sendo empregado GH ao invés de ENI e GHPR ao invés de ENIPR.

6.3.5.1. Resultados e discussão – especificidade GHPR

A Figura 18 apresenta os cromatogramas sobrepostos das soluções amostra e branco do GH.

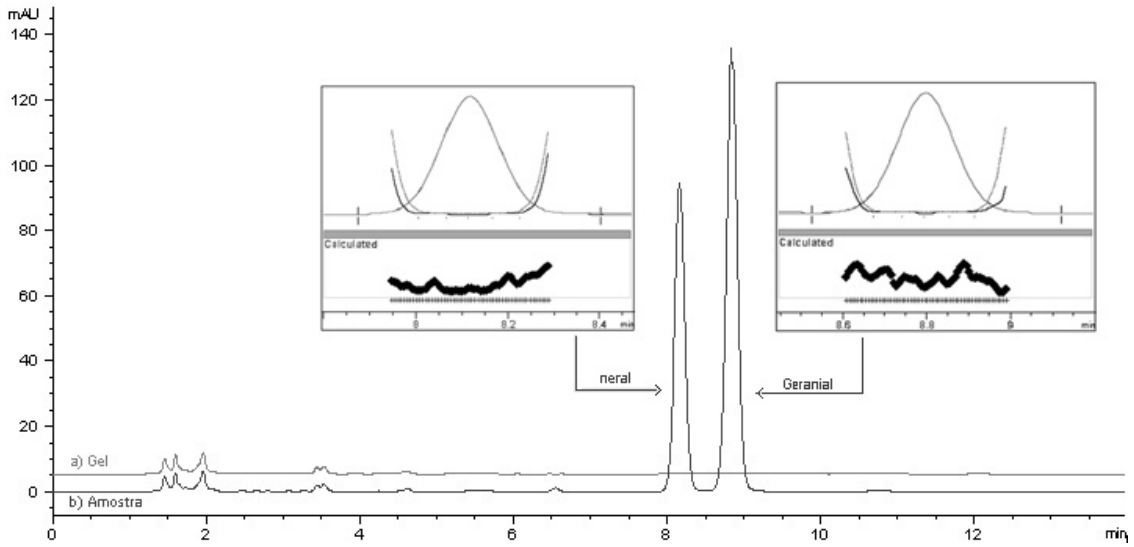


FIGURA 18. Cromatogramas sobrepostos da solução GH (a) e da solução GHPR (b). Pureza dos picos do neral e geranial.

A análise visual do cromatograma da solução branco (GH) não apresentou absorção em 240 nm nos tempos de retenção do neral e geranial. A análise da pureza dos picos do neral e geranial não detectou presença de interferentes e os índices de pureza de pico foram maiores que 999 para ambas substâncias. Estes resultados confirmam a especificidade do método.

6.3.6. Precisão GHPR

A precisão do método analítico foi realizada através da repetibilidade e da precisão intermediária, determinando-se o desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos na quantificação do neral, geranial e citral presentes na amostra de GHPR.

As amostras em análise foram preparadas como descrito no item *Precisão ENI*, sendo empregado GHPR ao invés de ENIPR.

As porcentagens de neral, geranial e citral, na amostra de gel, foram calculadas empregando as mesmas equações utilizadas na análise das micropartículas de βCD contendo óleo de *C. citratus* (Equações 14 e 15).

A precisão intermediária foi determinada através da análise dos resultados da repetibilidade, realizada por dois analistas, em dias diferentes.

6.3.6.1. Resultados e discussão – precisão GHPR

A Tabela 33 apresenta os resultados do ensaio de precisão da amostra de GHPR. Os valores de DPR inferiores a 2,0% estão de acordo com os limites encontrados na literatura para análise de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; ERMER, PLOSS, 2005).

TABELA 33. Resultados do ensaio de precisão na determinação de citral (neral e geranial) em amostra de gel hidrofílico*.

Ensaio	Neral		Geranial		Citral	
Repetibilidade	**$\%_{neral}$**	**DPR (%)**	**$\%_{geranial}$**	**DPR (%)**	**$\%_{citral}$**	**DPR (%)**
Analista1/Dia1[a]	0,263	0,80	0,358	0,73	0,621	0,76
Analista2/Dia2 [a]	0,264	1,29	0,359	1,35	0,623	1,32
Analista1/Dia3[a]	0,270	1,59	0,366	1,66	0,636	1,62
Precisão Intermediária[b]	0,266	1,72	0,361	1,54	0,627	1,61

[a] n = 6; [b] n = 18.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

6.3.7. Exatidão GHPR

A exatidão do método foi determinada através da avaliação da recuperação das micropartículas de MβCDOPR adicionadas a amostras de gel hidrofílico (GH). Foram analisadas cinco concentrações com duas réplicas cada.

As amostras em análise foram preparadas como descrito no item *Exatidão ENI*, sendo empregado GH ao invés de ENI.

As recuperações de neral, geranial e citral no ensaio de exatidão foram calculadas com as equações 16 - 18, adaptando as variáveis das equações (considerar como amostra as preparações contendo GH e como padrão a solução de MβCDOPR).

.

6.3.7.1. Resultados e discussão – exatidão GHPR

Os resultados do ensaio de exatidão para o GHPR, realizado através do método de recuperação, estão descritos na Tabela 34.

TABELA 34. Resultados do ensaio de exatidão para determinação de citral (neral e geranial) por CLAE-UV na amostra de GHPR*.

Amostra	Neral		Geranial		Citral	
	Recuperação média (%)	DPR (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
50%[a]	98,3	1,6	98,4	1,3	98,3	1,4
75%[a]	99,0	1,0	99,2	1,3	99,1	1,2
100%[a]	99,6	1,2	99,7	1,5	99,7	1,3
125%[a]	97,8	0,6	98,1	0,3	98,0	0,4
150%[a]	96,7	1,0	96,5	0,7	96,6	0,9
Média[b]	**98,3**	1,4	**98,4**	2,4	**98,3**	1,4

[a] n = 2; [b] n = 10.
* Detalhes dos resultados podem ser verificados em Anexo.

Os valores de recuperação, nos diferentes níveis avaliados, próximos a 100% e recuperação média no intervalo de 98 – 102% confirmam a exatidão do método.

6.3.8. Discussão de parâmetros analíticos para quantificação de neral e geranial em GHPR

As amostras de GHPR apresentaram resultados para os parâmetros cromatográficos dentro dos limites estabelecidos para adequabilidade do sistema (Robustez MPV) (Tabela 35).

Tabela 35. Resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema para amostra de GHPR no primeiro dia de precisão.

Parâmetro	Neral		Geranial	
	GHPR	AS	GHPR	AS
Fator capacidade (k')	4,60	>2,74	5,07	>3,02
Pratos teóricos (N)	17767	>17074	17843	>17074
Assimetria	1,01	<1,214	1,00	<1,197
Resolução	2,68	>2,164		

AS = adequabilidade do sistema determinada no ensaio de robustez da MPV.

Forte correlação entre as massas de MβCDOPR pesadas no teste de exatidão do GHPR e as áreas dos picos do neral e geranial foram verificadas (Figura 19). Estes resultados demonstram não haver evidência de alteração do comportamento linear do neral e geranial na faixa de concentração estudada.

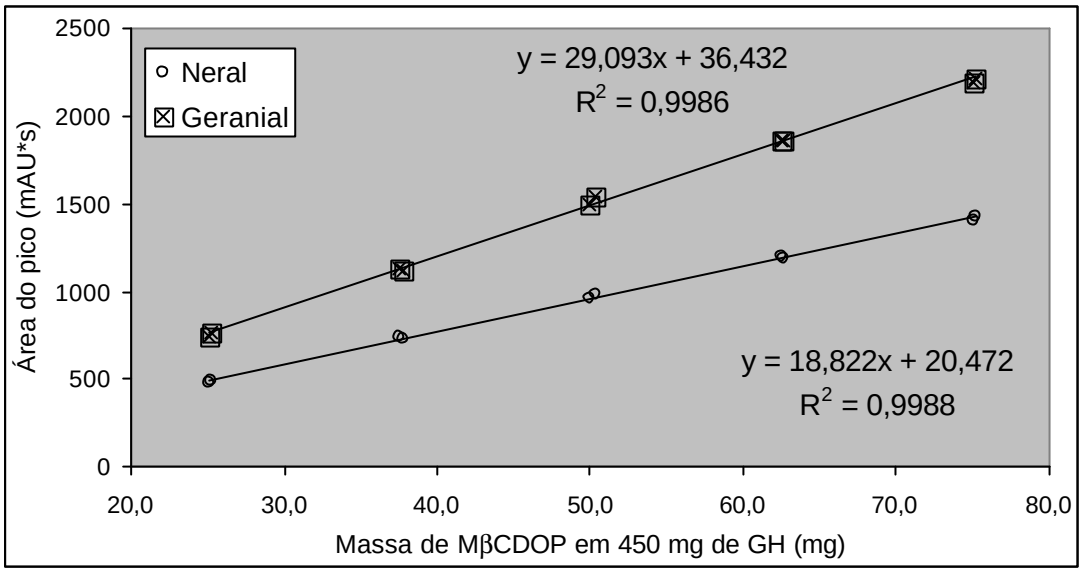


FIGURA 19. Relação das massas de MβCDOPR pesadas no ensaio de exatidão do GHPR e as áreas dos picos do neral e geranial em 240 nm.

Os resultados de especificidade, precisão e exatidão satisfatórios garantem a confiabilidade dos resultados obtidos para quantificação do neral, geranial e citral nas amostras de GH contendo micropartículas de β–CD com óleo de *C. citratus*.

6.4. Estabilidade preliminar das formulações

Para a realização dos testes de estabilidade, foram preparadas novas amostras de ENIs e GHs, como descrito no item 6.2, às quais adicionou-se MβCDOPR (15%) e MβCDOSA (15%).

As formulações ENIPR, ENISA, GHPR e GHSA foram acondicionadas em frascos plásticos, de parede dupla, com batoque e tampa rosqueável, com capacidade para 30 g. As amostras foram armazenadas em estufa, à

temperatura de 40 °C, por um período de 110 dias. Nos períodos de tempo determinados (T_{zero} e T_{110}), as amostras foram avaliadas em relação às características visuais, pH e à concentração do neral e geranial, de acordo com os métodos descritos neste trabalho.

6.4.1. Avaliação das características visuais e pH das formulações submetidas ao estudo de estabilidade

As formulações foram avaliadas em relação às suas características visuais, como cor, odor e aspecto e na determinação do pH. Estas avaliações foram realizadas para a base ENI, o GH e as formulações ENIPR, ENISA, GHPR e GHSA.

Para a determinação do pH, as amostras foram diluídas em água na concentração de 5% (m/v) e a medida dos valores realizada em potenciômetro (Digimed DM-20), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

6.4.1.1. Resultados e discussão – características visuais e pH

As características visuais e e valores de pH para as amostras referentes ao T_{zero} e T_{110} estão descritos na Tabela 36.

TABELA 36. Características visuais e pH das formulações submetidas a temperatura de 40 ºC.

Amostra	t (dias)	Descrição	pH
ENI	0	Cor branca, odor característico da base.	5,99
ENIPR	0	Cor branca, odor suave e característico do óleo.	5,60
	110	Apresentou coloração branca semelhante ao tempo zero, o odor característico do óleo reduzido e devido à perda de água, mostrou-se mais consistente.	4,29
ENISA	0	Cor branca, odor suave e característico do óleo.	5,64
	110	Apresentou coloração amarelada, foi abrasivo quando aplicado na pele, perdendo suas características originais. Odor característico.	4,49
GH	0	Incolor e inodoro	7,99
GHPR	0	Cor branca, odor suave e característico do óleo,	7,75
	110	Coloração branca semelhante ao tempo zero, traços do odor característico, maior consistência.	7,48
GHSA	0	Cor branca, odor suave e característico do óleo,	7,68
	110	Coloração branca semelhante ao tempo zero, odor diferente do característico, mas observou-se traços sutis do odor do óleo original. Consistência maior em relação ao tempo zero.	7,36

As formulações GHPR e GHSA, mostraram-se homogêneas em relação às características organolépticas, porém apresentaram coloração branca, diferente da base GH, incolor. A alteração na coloração foi associada à presença de micropartículas não dispersas, uma vez que a solubilidade intrínseca da ß-CD é de 1 g em 50 mL a 20 °C (ROWE *et al,* 2001). Em relação ao odor, as formulações ENIPR, ENISA, GHPR e GHSA, às quais foram adicionados os pós contendo as micropartículas, apresentaram odor característico do óleo, embora bem mais suave que a matéria-prima isolada.

Dentre as amostras submetidas ao teste de estabilidade a ENIPR manteve as características originais de cor, embora tenha apresentado maior consistência, provavelmente devido à perda de água.

A formulação ENISA perdeu as características originais, tornando-se um produto com aspecto pouco atrativo. Além disso, observou-se material cristalizado na formulação com características abrasivas desagradáveis.

Os géis GHPR e GHSA mantiveram as características originais de cor, porém apresentaram maior consistência no tempo 110 dias. Esta característica pode ser associada a perda de água pela formulação.

As formulações de gel e emulsões contendo micropartículas apresentaram aspecto adequado com marcante, porém não intenso, odor característico do óleo de *C. citratus*. Isto foi considerado uma vantagem, uma vez que a suavização do odor do óleo torna o produto mais atrativo.

Os valores de pH obtidos no tempo zero situaram-se dentro da faixa adequada ao uso tópico (GENNARO, 2000). O óleo de *C. citratus* possui caráter ácido (pH = 4,69 para solução 5% de óleo em etanol 70%) e as formulações contendo o óleo apresentam pH mais baixo que suas bases.

Todas as formulações apresentaram redução nos valores de pH após 110 dias de armazenagem à 40 °C (demonstrada na Tabela 35), o que sugere a necessidade de adição de substância que reduza a variação de pH da formulação das ENI e GH. O efeito do pH nos formulações com GH foi menos pronunciado devido à presença de trietanolamina na formulação.

6.4.2. Avaliação dos teores de citral (neral e geranial) no estudo de estabilidade acelerada

As amostras de ENIPR, ENISA, GHPR e GHSA submetidas ao ensaio de estabilidade foram avaliadas por CLAE em relação aos teores de citral (neral e geranial), nos tempos T_{zero} e T_{110}.

A avaliação dos teores de neral, geranial e citral foi, também, realizada para as amostras de MβCDOPR e MβCDOSA, acondicionadas em vidro de relógio, submetidas à temperatura de 40 °C por 110 dias e analisadas nos tempos T_{zero}, T_{47} e T_{110}.

6.4.2.1. Resultados e discussão – avaliação dos teores na estabilidade

A Tabela 37 demonstra os teores de citral (neral e geranial) para as amostras MβCDOPR e MβCDOSA, submetidas ao ensaio de estabilidade, nos tempos T_{zero}, T_{47} e T_{110}.

TABELA 37. Teores de citral (neral e geranial) nas amostras MbCDOPR e MbCDOSA submetidas ao ensaio de estabilidade.

	Neral (%)			Geranial (%)			Citral (%)		
Tempo (dias)	**0**	**47**	**110**	**0**	**47**	**110**	**0**	**47**	**110**
MbCDOPR	100,0	73,7	61,0	100,0	76,3	65,6	100,0	75,4	63,9
MbCDOSA	100,0	56,6	40,2	100,0	57,2	40,5	100,0	57,0	40,4
Média	100,0	65,0	50,4	100,0	66,9	53,2	100,0	66,2	52,1

Para as amostras de MβCDOPR e MβCDOSA submetidas ao ensaio de estabilidade, foi possível observar o decaimento dos teores de neral, geranial e, consequentemente, citral (Tabela 37). Além disso, não foi possível verificar diferenças significativas em relação ao decaimento dos isômeros, uma vez que o teor de neral decaiu em torno de 65%, geranial em torno de 66,9% e citral em torno de 66,2%.

As amostras MβCDOPR e MβCDOSA foram avaliadas quanto às diferenças dos teores apresentados para cada método de preparação. A Figura 20 apresenta os resultados de estabilidade das amostras MβCDOPR e MβCDOSA, para os tempos T_{zero}, T_{47} e T_{110}, onde verifica-se a menor perda do teor de citral (neral e geranial) para a amostra obtida por PR. Este resultado demonstra que o método por precipitação favorece a manutenção do teor de citral, em comparação com o método de SA.

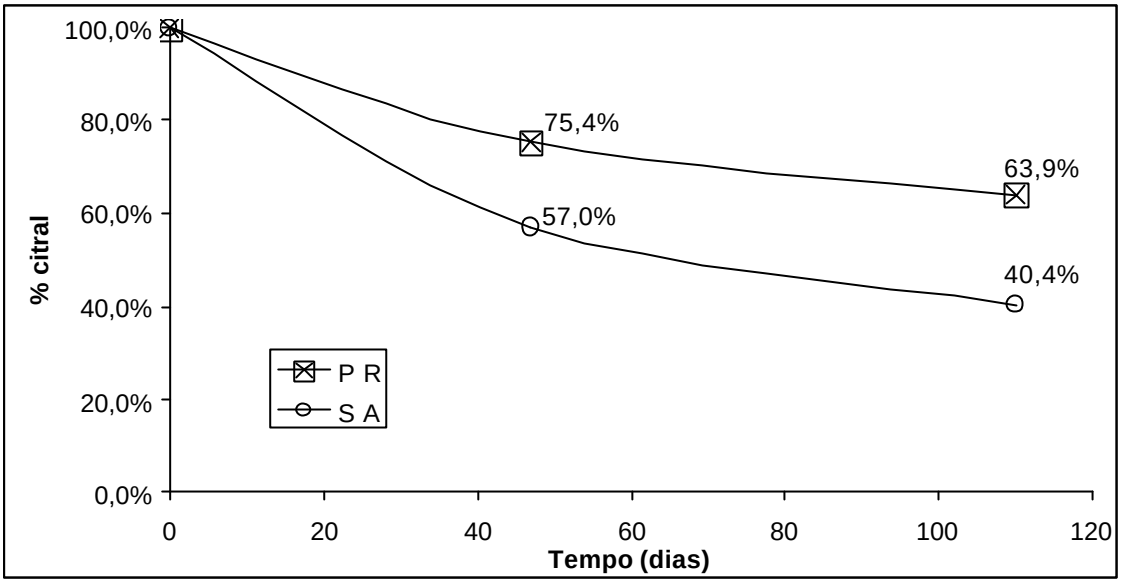


FIGURA 20. Resultados de estabilidade a 40 °C para as amostras Mb CDOPR e Mb CDOSA no T_{zero}, T_{47} e T_{110}.

A Tabela 38 apresenta os resultados de estabilidade em relação ao teor de neral, geranial e citral para as amostras ENIPR, ENISA, GHPR e GHSA, após 110 dias de armazenagem a 40 °C. As análises foram realizadas nos tempos T_{zero} e T_{110}.

TABELA 38. Porcentagens de citral (neral e geranial) encontradas nas formulações após 110 dias de armazenagem a 40 °C.

Formulação	Neral (%)	Geranial (%)	Citral (%)
ENIPR	79,1	90,7	86,7
ENISA	66,4	75,8	72,2
GHPR	73,3	96,4	88,3
GHSA	72,0	110,3	95,5

O teor de neral apresentou redução mais acentuada que o geranial, para todas as formulações avaliadas (Tabela 38). Este comportamento não foi verificado para as micropartículas, onde os teores de neral e geranial decaíram de maneira similar (Tabela 37).

Os géis apresentaram maiores teores de citral em comparação com as ENIs. Porém, a conclusão de que os géis melhoram a estabilidade em relação

ao teor de citral, ficou prejudicada pela perda de água evidenciada para este tipo de formulação. Neste contexto, o valor de 110,3% de geranial obtido para GHSA pode ser devido à perda de água da formulação. Para evitar o aumento da consistência devido à perda de água, sugere-se o uso de material de embalagem que reduza a evaparoção do solvente (bisnaga, por exemplo).

A preparação das amostras dos géis para análise por CLAE apresentou uma limitação na etapa de filtração por membrana, uma vez que o filtro de 0,45 μm apresentou a desvantagem de saturar rapidamente, sem que estes possam ser reaproveitados.

O teor de citral <80% apresentado pela formulação ENISA pode estar associado à quantidade de formulação que preenchia apenas 2/3 do frasco plástico. Nesta situação, a volatilização do citral pode ter sido favorecida, com conseqüente aumento da velocidade de queda de teor do óleo volátil.

Entre as formulações avaliadas, a ENIPR foi a única a mostrar-se estável em relação às características visuais após 110 dias à 40 ºC. Porém, deve-se considerar a grande variação de pH observado nesta formulação. Maiores investigações em torno da degradação e do pH são necessárias para determinar qual ação corretiva será mais adequada para este parâmetro.

As formulações contendo micropartículas desenvolvidas neste estudo foram comparadas, em relação aos teores de citral, com formulações contendo óleo, preparadas por SILVA (2005). As condições de armazenagem de ambos os estudos foram as mesmas (embalagem e temperatura). Os teores de citral nas formulações com micropartículas (> 85%), após 110 dias de armazenagem a 40 ºC são equivalentes aos resultados obtidos por SILVA (2005) em 60 dias. Assim, fica evidenciada a proteção do óleo promovida pela microencapsulação com β-CD.

6.5. Conclusões

O método analítico por CLAE-UV para a formulação ENIPR e GHPR, adequado do método para as micropartículas, apresentou resultados satisfatórios para especificidade, precisão e exatidão.

A ENIPR foi a formulação que manteve as características visuais adequadas durante o estudo de estabilidade preliminar das formulações. Porém, as emulsões devem ter o pH controlado, de maneira a evitar as alterações verificadas.

A inclusão do óleo de *C. citratus* nas micropartículas tornou o odor dos produtos mais agradável e, além disso, as micropartículas foram capazes de prolongar a estabilidade do óleo de *C. citratus* nas formulações avaliadas.

Finalmente, frascos plásticos que propiciem maior proteção em relação a perda de água e volatilização do óleo devem ser considerados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por um produto fitoterápico eficaz no tratamento tópico de micoses superficiais, levou ao interesse em desenvolver preparações farmacêuticas contendo o óleo de *C. citratus.*

A fim de contornar o problema da volatilização apresentada pelo óleo de *C. citratus*, micropartículas contendo esta matéria-prima foram desenvolvidas e avaliadas e, posteriormente, incorporadas em formulações farmacêuticas.

A técnica de preparação das micropartículas que mostrou-se mais adequada foi a precipitação, utilizando a β–CD como material encapsulante. A formulação ENIPR mostrou-se mais estável, promovendo melhor proteção do óleo volátil.

O desenvolvimento e validação da técnica analítica por CLAE-UV para quantificação dos isômeros neral e geranial presentes na matéria-prima, nas micropartículas e em formulações contendo as micropartículas, foi de grande importância para este trabalho.

A continuidade deste estudo deve considerar ensaios pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar a eficácia e segurança das micropartículas contendo óleo de *C. citratus* incorporadas em formulações farmacêuticas.

8. REFERÊNCIAS

ABE, S.; SATO, Y.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; MARUYAMA, N.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; YAMAGUCHI, H. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. **Jpn. J. Med. Mycol**, Tokyo, v. 44, n. 4, 2003. (Resumo).

ADEGOKE, G.O.; ODESOLA, B.A. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agentes of biodeterioration using the powder and essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus)*. **Inter. Biodeter. Biodegr.**, v. 62, p. 81-84, 1995.

AL-OMRAN, M. F.; AL-SUWAYEH, S. A.; EL-HELW, A. M.; SALEH, S. I. Taste lasking of diclofenac sodium using microencapsulation. **J. Microencapsul.,** London, v.19, n. 1, p. 45-52, 2002.

ALVES, G. P., SANTANA, M. H. A. Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technology**, v.145, p.139-148, 2004.

ALZAMORA, L.; MORALES, L.; ARMAS, L.; FERNÁNDEZ, G. Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. **An. Fac. Med**, Lima, v. 62, n. 2, p. 156-161, 2001.

AULTON, M. E.; **Delineamento de formas farmacêuticas.** Trad. George G. Ortega *et al*. – 2 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2005.

ARAMENDÍA, M.A.; BORAU, V.; JIMENÉZ, C.; MARINAS, J.M.; PORRAS, A.; URBANO, F.J. Selective liquid-fase hidrogenation of citral over supported palladium. **J. Cathalyses**, v. 172, p. 46-57, 1997.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour Fragr. J**, Chichester, v. 13, p. 235-244, 1998.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P.R.; DEWETTINCK, K.; VERHÉ, R. Properties of orégano (*Origanum vulgare L*.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.), and marjoram (*Majorama hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein – based matrices. **Food research Int.,** v. 39, p. 413 – 425, 2006.

BECK, R.C.R. **Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorrevestidas: caracterização físico-química e biológica** Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Tese de Doutorado. Ed Gráfica UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

BERISTAIN, C. I.; GARCIA, H. S.; VERNON-CARTER, E. J. Spray-dried Encapsulation of Cardamom (*Ellettaria cardamomum*) Essential Oil with Mesquite (*Prosopis juliflora*) Gum. **Lebensm. Wiss. u.- Technol,** v. 34, p. 398-401, 2001.

BERTOLINI, A. C.; SIANI, A. C.; GROSSO, C.R.F. Stability of monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. **J. Agric. Food Chem,** Easton, v. 49, p. 780-785, 2001.

BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T. Lemon oil to β-cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β-cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 46, p. 1494-1499, 1998.

BILLON, A.; BATAILLE, B. CASSANAS, G. JACOB, M. Development of spray-drying acetaminophen microparticles using experimental designs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 203, n. 1-2, p. 159-168, 2000.

BLANCO, M. D.; BERNARDO, M. V.; SASTRE, R. L.; OLMO, R.; MUNIZ, E.; TEIJON, J. M. Preparation of bupivacaine-loaded poly(e-caprolactone) microspheres by spray-drying: drug release studies and biocompatibility. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Sttutgart, v. 55, n. 2, p-229-236, 2003.

BRASIL. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - 2/2003. **Diário Oficial** da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRITISH Pharmacopoeia. United Kingdom : Stationery Office, 2007. Versão em CD.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S.K.E.; RHODES, C.T. The spray-drying of pharmaceuticals. **Drug Dev. Ind. Pharm.,** v. 18, n. 11-12, p. 1169-1206, 1992.

BRUSCHI, M.L.; CARDOSO, M.L.C.; LUCCHESI, M.B.; GREMIÃO, M.P.D. Gelatin microparticles containing própolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **Int. J. Pharm.** V. 264, p. 45-55, 2003.

CARLSON, L.H.C.; MACHADO, R.A.F.; SPRICIGO, C.B.; PEREIRA, L.K.; BOLZAN, A. Extration of lemon grass essential oil with dense carbon dioxide. **J. Supercrit. Fluids**, v. 21, p. 33-39, 2001.

CARMO, C.M.F.; LIMA, E.O.; MILAN, E.P. Atividade antifúngica de extratos e óleos essenciais contra *Candida albicans* isolada de pacientes com AIDS. **Rev. Bras. Farm**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 3/4, p. 108-111, 1998.

CDER – Center of Drug Evaluation and Research. **Rewiewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods.** US Food and Drug Administration, 1994.

CHAN, K.K Quantification of monoterpenoids compounds with potential medicinal use in biological fluids. **J. Chrom. A**, v. 936, p. 47-57, 2001.

CHANFRAU, J.E.R.; FUENTES, L.; RUIZ, Z.P.; GARMA, M. Estabilidad de extractos fluidos al 70% de *Cymbopogon citratus*. **Rev. Cuba Plantas Med**, La Habana, v. 8, n. 2, p. 0-0, 2003.

CHAUMONT, J-P.; LÉGER, D. Lutte contre les moisissures allergisants des habitations. Propriétés inhibitrices de l'huile essentielle de géranium 'Bourbon', du citronellol, du géraniol et du citral. **Ann. Pharm. Fr**, Paris, v. 50, n. 3, p. 156-166, 1992.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTÉ, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 79, p. 213-220, 2002.

CROSBY, E.J.; MARSHALL, W.R. Chemical Engineering Progress, v. 54, n. 7, p. 56, 1958 apud WALTON, D.E. The Morfology of Spray-Dried Particles: a Quantitative View, **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p. 1943-1986, 2000.

CRUAUD, O.; BENITA, S.; BENOIT, J.P. The caracterization and release kinetics evaluation of baclofen microspheres designed for intrathecal injection. **Int. J. Pharm.** v. 177, p. 247-257, 1999.

DELGADO, A.; LAVELLE, E.C.; HARTSHORNE, M.; DAVIS, S.S. PLG microparticles stabilised using enteric coating polymers as oral vaccine delivery system. **Vaccine,** v.17, p. 2927 – 2938, 1999.

DÍEZ, V.K.; DI COSIMO, J.I.; APESTEGUÍA, C.R. Study of the citral/acetone reaction on Mg_yAlO_x oxides: effect of the chemical composition on catalyst activity, selectivity and stability. **Apllied Catalysis A: General**, v. 345, p. 143-151, 2008.

DJORDJEVIC, D.; CERCACI, L.; ALAMED, J.; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Stability of citral on protein- and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. **Food Chem.**, v. 106, p. 698-705, 2008.

DOMINGUES, G.S. **Caracterização físico-química e avaliação dos perfis de liberação *in vitro* de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas.** 2006. 161 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

EDRIS, A.; BERGNSTAHL, B. Encapsulation of Orange oil in spray dried Double emulsion. **Nahrung Food**, v. 45. n. 2, p. 133-137, 2001

EL-KAMALI, H.H.; AHMED, A.H.; MOHAMMED, A.S.; YAHIA, A.A.M.; EL-TAYEB, I.H.; ALI, A.A. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts**.** **Fitoterapia**, Milano, v. 69, n. 1, p. 77-78, 1998.

EL-KAMEL, A.H.; SOKAR, M.S.; AL GAMAL, S.S.; NAGGAR, V.F. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. **Int. J. Pharm.**, v. 220, p. 13-21, 2001.

ERMER, J.; PLOSS, H. Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. **J. Pharma. Biom. Analysis** v. 37, p. 859-870, 2005.

ESPOSITO, E.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.; CORTESI, R. Spray died eudragit microparticles an encapsulation devices for vitamin C. **Int. J. Pharm.**, v. 242, p. 329-334, 2002.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FERREIRA, M.S.C.; FONTELES, M.C. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão). **Rev. Bras. Farm**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 94-97, 1989.

FRANSSEN, O.; HENNINK, W. E. A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 168, p.1-7, 1998.

FREEBURG, E.J.; MISTRY, B.S.; REINECCIUS, G.A. Stability of citral-containing and citralless lemon oils in flavour emulsions and beverages. **Perfum. Flavor**,Wheaton, v. 19, p. 23-32, 1994.

FREITAS, S.; RUDOLF, B.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Flow-through ultrasonic emulsification combined with static micromixing for aseptic production of microspheres by solvent extraction. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 61, p. 181-187, 2005.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; LEVIN, C.E.; MANDRELL, R.E. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* 0157:H17 and *Salmonella enterica* in apple juice. **Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6042-6048, 2004.

GENNARO, A.R. (Ed.) **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GIUNCHEDI, O.; GENTA, I.; CONTI, B.; MUZZARELLI, R.A.A.; CONTE, U. Preparation and characterizatiom of ampicillin loaded methylpyrrolidine chitosan and chitosan microspheres. **Biomaterials**, v. 19, p. 157-161, 1998.

GUENTHER, E. **The essential oils**. Toronto: D. Van Nostrand Company, v. 4, p. 20-65, 1950.

GUPTA, A.K.; MYRDAL, P.B. Development of a perillye alcohol topical cream formulation. **Int. J. Pharm.**, v. 269, p. 373-383, 2004.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. PH-Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflamatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharma. Research,** v. 12, p. 1-3, 1995a.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J.; PUISIEUX, F. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: formulation and stability study. **Int. J. Pharm.** v. 113, p. 57-63, 1995b.

GUTERRES, S.S.; WEISS, V.; LUCCA FREITAS, L.; POHLMANN, A.R. Influence of benzyl benzoato as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7, p. 195-199, 2000.

GUTERRES, S.S.; MULLER, C.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA COSTA, T. Gastrointestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 11, p. 229-233, 2001.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity oils and other plant extracts. **J. Applied Microbiol**, Oxford, v. 86, p. 985-990, 1999.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **Inter. J Aromatherapy**, Provence, v. 12, n. 2, p. 83-91, 2002.

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **J. Pharma. Biom. Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

HUDAIB, M.; BELLARDI, M.G.; RUBIES-ANTONELL, C.; FIORI, J.; CAVRINI, V. Chromatographic (CG-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV. **Il Fármaco**, v. 56, p. 219-227, 2001.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Guideline on Stability Testing of New Drug Substance and products Q1A(R2). In: **International Conference Harmonization of Technical Requirenebts for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2003.

INOUYE, S.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. **Mycoses**, Berlin, v. 44, p. 99-107, 2001.

INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). **Int. J. Aromather**, Provence, v. 13, n. 2/3, p. 95-107, 2003.

JEON, Y-J; VASANTHAN, T.; TEMELLI, F.; SONG, B-K. The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. **Food Research Int.**, v. 36, p. 349-355, 2003.

KIM, Y. D.; MORR, C. V.; SCHENZ, W. Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Liquid Orange Oil Emulsion Particles. **J. Agric. Food Chem,** Easton, v.44, p. 1308-1313, 1996.

KIM, Y. D.; MORR, C. V. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. **J. Agric. Food Chem.** V. 44, p. 1314-1320, 1996.

KIM, H-J; KIM, K; KIM, N-S; LEE, D-S. Determination of floral fragrances of *Rosa hybrida* usimg solid-fase trapping-solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chrom. A**, v. 902, p. 389-404, 2000.

KIM, S-IL; YI, J-H.; TAK, J-H.; AHN, Y-J. Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: dermanyssidae). **Vet. Parasitol**, Amsterdan, v. 120, p. 297-304, 2004.

KISHORE, K.; MISHRA, A.K.; CHANSOURIA, J.P.N. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. **Mycoses**, Berlin, v. 36, p. 211-215, 1993.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A. C.; SINGHAL, R. S. The use of gum Arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydr. Polym.** V. 62, p. 309-315, 2005.

KURITA, N.; MIYAJI, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. **Agric. Biol. Chem**, Tokyo, v. 45, n. 4, p. 945-952, 1981.

LACASSE, F. X.; FILION, M. C.; PHILLIPS, M. C.; ESCHER, E.; MCMULLEN, J. N.; HILDGEN, P. Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein adsorption and phagocytosis. **Pharm. Res.,** New York, v. 15, n. 2, p 312-317, 1998.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C.-M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Sttutgard, v. 49, p 1-9, 2000.

LEE, J. H.; PARK, T. G.; CHOI, H. K. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs by W/O/O double emulsion solvent diffusion method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 75-83, 2000.

LEE, J.I.; YOO, H.S. Biodegradable microspheres containing poly (e – caprolactone) – Pluronic block copolymers for temperature – responsive release of proteins. **Coloids and Surfaces,** v. 61, p. 81-87, 2008.

LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; PAULO, M.Q.; GIESBRECHT, A.M. *In vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. **Rev. Microbiol**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 235-238, 1992.

LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; GIESBRECHT, A.M.; PAULO, M.Q. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, Berlin, v. 36, p. 333-336, 1993.

LIU, J.; CHAN, S. Y.; HO, P. C. Polymer-coated microparticles for the sustained release of nitrofuratoin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 54, n. 9, p. 1205-1212, 2002.

LOCKWOOD, G.B. Techiniques for gas chromatography of volatiles terpenoids from a range os matrices. **J. Chrom. A**. v. 936, p. 23-31, 2001.

MAHMOUD, A.L-E. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. . **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 19, p. 110-113, 1994.

MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Appl. Envir. Microbiol**, Washington, v. 60, n. 4, p. 1101-1105, 1994.

NIST – National Institute of Standards and Technology. Disponível em: http://webbook.nist.gov/chemistry. Acesso em 11/10/2008.

O'DONNELL, P.; MCGINITY, J. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Ad. Drug Del. Reviews**, v.28, p.25-42, 1997.

O'DONNELL, P.; MCGINITY, J. Influence of processing on the stability and release properties of biodegradable microspheres containing thioridazine hydrochloride. **Eur. J. Pharm. Biopharm.,** v. 45, p. 83 – 94, 1998.

OGUNLANA, E.O.; HÜGLUND, S.; ONAWUNMI, G.; SKÖLD, O. Effects of lemongrass oil on morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. **Microbios**, Cambridge, v. 50, p. 43-59, 1987.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W-AB; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 12, p. 279-286, 1984.

ONAWUNMI, G.O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 9, p. 105-108, 1989.

ONEDA, F.; RÉ, M. I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dryed microspheres containing organic salts. **Powder Technol.**, Amsterdam, v. 130, p. 377-384, 2003.

OYEDELE, A.O.; GBOLADE, A.A.; SOSAN, M.B.; ADEWOYIN, F.B.; SOYELU, O.L.; ORAFIDIYA, O.O. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 9, p. 259-262, 2002.

PALHANO, F.L.; VILCHES, T.T.B.; SANTOS, R.B.; ORLANDO, M.T.D.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 95, p. 61-66, 2004.

PALMIERI, G.F.; BONACUCCINA, G.; DI MARTINO, P.; MARTELLI, S. Microencapsulation of semisolid ketoprofen/polymer microspheres. **Int. J. Pharm.,** v. 242, p. 175-178, 2002.

PATTANAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; RATH, C.C. Effect of essential oils on the viability and morphology of *Escherichia coli* (SP-11). **Microbios**, Cambridge, v. 84, p. 195-199, 1995.

PAVIANI, L.; PERGHER, S.B.C.; DARIVA, C. Aplication of molecular sieves in the fractionation of lemongrass oil from high-pressure carbon dioxide extration. **Brazilian J. Chem. Engi.**, v. 23, p. 219-225, 2006.

PÉREZ-ALONSO, C.; BÁEZ-GONZÁLES, J.G.; BERISTAIN, C.I.; VERNON-CARTER, E.J.; VIZCARRA-MENDOZA, M.G. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 53; p. 197-203, 2003.

RAFFIN, R.P.; COLOMÉ, L.M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Preparation, characterization and *in vivo* anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. . **Eur. J. Pharm. Biopharma.** v. 63, p. 198-204, 2006.

RAFFIN, R.P.; COLOMÉ, L.M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Enteric controlled release pantoprazole-loaded microparticles prepared using Endragit S100 and poly(e-caprolactone) bçend. **Pharm. Dev.Tech.** v. 12, p. 1-9, 2007.

RAJAPAKSE, R.; VAN EMDEN, H.F. Potential of four vegetable oils and ten botanical powders for reducing infestation of cowpeas by *Callosobruchus maculates*, *C. chinesis* and *C. rhodesianus*. **J. Stored. Prod. Res**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 59-68, 1997.

RAUBER, C.S. **Desenvolvimento e controle de qualidade de formas farmacêuticas plásticas contendo o óleo volátil de *Cymbopogon citratus***. 2001. 162 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

RAUBER, C.S.; GUTERRES, S.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. **J. Pharm. Biomed. Anal**, Oxford, v. 37, p. 597-601, 2005.

RAVI KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J. Pharm. Pharmac. Sciences**, v.3, p.234-258, 2000.

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GFPFERICH, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides, **J. Control. Release** v. 73, p. 339– 350, 2001.

REDDY, M.V.B.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaria* against *Botytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochem.**, v. 47, p. 1515-1520, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. C. Validação em métodos cromatográficos e eletrofóreticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors Affecting Retention in Spray-Drying Microencapsulation of volatiles materials. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, p. 1288-1294, 1990.

ROSENBERG, M; SHEU, T-Y. Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. **In. Dairy Journal**, v. 6, p. 273-284, 1996.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; WELLER, P.J. **Handboock Pharmaceutical Excipients.** Londres, Pharmaceutical Press, 2001. Versão em CD.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of diferent origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem**, Barking, v. 91, p. 621-632, 2005.

SAIKIA, D.; KHANUJA, S.P.S.; KAHOL, A.P.; GURTA, A.P.; KUMAR, S. Comparative antifungal activity of essential oils and constituints from trhee distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. **Current Science**, v. 80, p. 1264-1266, 2001.

SCHUCK, V.J.A.; FRATINI, M.; RAUBER, C.S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E.E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.

SHABIR, G.A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, the US Pharmacopeia and the ICH. **J. Chrom. A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

SILVA, C.B. **Novas formas farmacêuticas contendo óleo volátil de *Cymbopogon citratus*: estudos de formulação, estabilidade e atividade biológica.** 2005. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SILVA, C.B.; GUTERRES, S.S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *albicans* and *non-albicans Candidas spp*…**The Braziliam J. Infectious Diseases.** V. 12, n-1, 2008, artigo IN PRESS.

SIMÕES, C. M. O. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**, 4° ed., p. 40, Editora da Universidade/UFRGS, 1995.

SOLIMAN, K.M.; BADEAA, R.I. Effect of oil ectrated from some medicinal plants on different mycotoxigen fungi. **Food Chem. Toxicology**, v. 40, p. 1669-1675, 2002.

STAHL, M. **Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology.** Agilent Technologies, 2003. Versão eletrônica acessada no endereço eletrônico: www.agilent.com/chem em julho de 2004.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, R.; PINZÓN, M.H.; RAMÍREZ, J. Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (*Citrus sinensis*). **J. Chrom. A**, v.752, p. 217-222, 1996.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technology**. v. 2, n.3, p. 12-20, 1998.

TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S. Preparation of enteric-coated microcapsules for tableting by spray-drying technique and in vitro simulation of drug release from the tablet in GI tract. **J. Pharm. Scienc.**, Washington, v. 69, n. 12, 1980.

TAO, L.; PEREIRA, M.A. Quantification of carvone, cineole, perillaldehyde, peril alcohol and sobrerol by isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Chrom. A**, New York, v. 793, p. 71-76, 1998.

TEISSEDRE, P.L.; WATERHOUSE, A.L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 3605-3801, 2000.

THE MERCK INDEX. Whitehouse station: New Jersey, 2000. Versão em CD.

THIES, C. A Survey of Microencapsulation Process. In: BENITA, S. **Microencapsulation: Methods and Industrial Applications.** 10th ed. New York: Marcel Dekker, 1996. Cap. 1, p. 1-19.

TISSERAND, R. Essential oil safety I. **Inter. J Aromatherapy**, Provence, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996.

TUNCAY, M.; CALIS, S.; KAS, H. S.; ERCAN, M. T.; PEKSOY, I.; HINCAL, A. A. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: formulation considerations and in vitro/ in vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 195, p. 179-188, 2000.

UENO, T.; MASUDA, H.; HO, C-T. Formation mechanism of *p*-methylacetophenone from citral via *tert*-alkoxy radical intermediate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52 (18), p. 5677-5684, 2004.

USP 31. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 31th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VALERO, M.; SALMERON, M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Baccilus cereus* in tyndallized carrot broth. **Int. J. Food Microbiology**, v. 85, p. 73-81, 2003.

VARTAK, P.H.; TUNGIKAR, V.B.; SHARMA, R.N. Comparative repellent properties os certain chemicals against mosquitoes, house flies and cockroaches usind modified techniques. **J. Commun. Dis**, Delhi, v. 26, n. 3, p. 156-160, 1994.

VILLA, C.; GAMBARO, R.; MARIANI, E.; DORATO, S. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of 24 fragrances allergens to study scented produtcts. **J. Pharm. Biom. An.** V. 44, p. 755-762, 2007.

WALECZEK, K. J.; MARQUES, H. M. C.; HEMPEL, B.; SCHIDT, P.C. Phase solubility studies of pure (-)–a- bisabolol and chamomile essential oil with ß-cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Biopharm,** v. 55, p. 247 – 251, 2003.

WALTON, D.E. The Morfology of Spray- Dried Particles: a Quantitative View, **Drying Tech.**, v.18, n. 9, p. 1943-1986, 2000.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SOONTORNTANASART, T. Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass cream. **Phytother. Res**, London, v. 10, p. 551-554, 1996.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRWANGEHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thain medicinal plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, p. 233-236, 2005.

WATSON, G.D. High pressure liquid chromatography. In: _____. **Pharmaceutical Analysis:** A textbook for pharmacu students and pharmaceutical chemists. London: Churchill Livinstone, 2005c. Cap 12, p. 237-276.

WEISS, E.A (1997) In: LEVINSONHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, E.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., Poaceae. **Annals of Botany**. V. 81, p. 35-39, 1998.

WIELAND-BERGHAUSEN, S.; SCHOTE, U.; FREY, M.; SCHMIDT, F. Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nytenpyram and clomipramine HCl. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 85, n.1-3, p. 35-43, 2002.

WOLKEN, W.A.M.; TRAMPER, J.; VAN DER WERF, M.J. Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *Penicillium digitatum*. **Biotechnol. Bioeng**, New York, v. 80, n. 6, p. 685-690, 2002.

YAMADA, T.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Sustained release ketoprofen microparticles with ethylcellulose end carboxymethylcellulose. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 75, p. 271-282, 2001.

ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; LIMBERGER, R.P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS activities of liquid and spary-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian *false Melissa*). **J. Ethnopharmacol,** Lausanne, v. 82, p. 207-215, 2002.

ANEXOS

ANEXO – Origem das equações

Linearidade MPV (Equações 2 e 3)

- ***Neral Padrão* (massa)**

Massa de neral: determinar a massa de neral considerando o volume e a densidade do citral padrão, bem como a porcentagem determinada por CG-DIC.

$$mp_{neral} = d_p \times v_p \times T_{neral}$$

Onde: mp_{neral} = massa de neral padrão em mg; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; v_p = volume de citral padrão em mL; T_{neral} = teor de neral no citral padrão.

- **Fator de diluição Neral (Fd_{neral}):**
  - **100 mL de citral padrão→ BV 25 (Fd = 25);**
  - **2 mL → BV 25 mL (Fd = 25 / 2 = 12,5);**
  - **V_{SE} → BV 20 mL (Fd = 20 / V_{SE});**
  - $Fd_{Neral} = \frac{25 \times 12{,}5 \times 20}{V_{SE}} = \frac{6250}{V_{SE}}$ **,**

Onde: V_{SE} = volume de solução estoque de citral empregado.

- **Concentração de neral:**

$$[neral] = \frac{mp_{neral}}{FD_{neral}} = \frac{d_p \times v_p \times T_{neral}}{\frac{6250}{V_{SE}}} = \frac{d_p \times v_p \times T_{neral} \times V_{SE}}{6250}$$

Onde: [neral] = concentração de neral padrão em mg/mL.

- **Para obtenção da concentração em mg/mL, basta multiplicar o valor de mp por 1000 (mg → mg). Assim, têm-se:**

$$[neral] = \left(\frac{d_p \times v_p \times T_{neral} \times V_{SE}}{6250}\right) \times 1000$$

- **Finalmente:**

$$[\text{neral}] = \frac{d_p \times v_p \times T_{neral} \times V_{SE}}{6{,}25}$$

- **As concentrações de geranial foram calculadas de maneira similar as concentrações de neral e a fórmula empregada foi:**

$$[\text{geranial}] = \frac{d_p \times v_p \times T_{geranial} \times V_{SE}}{6{,}25}$$

Onde: [geranial] = concentração de geranial em mg/mL; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; v_p = volume de citral padrão em mL; $T_{geranial}$ = teor de geranial no citral padrão; V_{SE} = volume de solução estoque em mL.

PRECISÃO MPV (Equações 5 e 6)

- ***Concentração da solução de neral na solução amostra (óleo de C. citratus diluído)***

$$[\text{Neral}]_a = \frac{[\text{Neral}]_p \times A_a}{A_p} = \frac{\left(\frac{d_p \times v_p \times T_{Neral}}{Fd_p}\right) \times A_a}{A_p} = \frac{d_p \times v_p \times T_{Neral} \times A_a}{Fd_p \times A_p}$$

Onde: $[\text{Neral}]_a$ = concentração de neral, em mg/mL; $[\text{Neral}]_p$ = concentração de neral padrão em mg/mL; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; v_p = volume de citral padrão em mL; T_{neral} = teor de neral no citral padrão; Fd_p = fator de diluição do padrão.

- ***Quantidade de neral na amostra de C. citratus*:**

$$q_{Neral} = [\text{Neral}]_a \times Fd_a = \frac{d_p \times v_p \times T_{Neral} \times A_a}{Fd_p \times A_p} \times Fd_a$$

Onde: q_{neral} = quantidade de neral na amostra de *C. citratus*, em mg; Fd_a = fator de diluição da amostra.

Note que: $Fd_p = Fd_a$, então:

$$q_{Neral} = \frac{d_p \times v_p \times T_{Neral} \times A_a}{A_p}$$

- **Porcentagem de Neral na amostra de *C. citratus*:**

$$\%_{neral} = \frac{q_{neral}}{q_{amostra}} \times 100\% = \frac{\left(\frac{d_p \times v_p \times T_{Neral} \times A_a}{A_p}\right)}{d_a \times V_a} \times 100\% = \frac{d_p \times v_p \times T_{Neral} \times A_a}{A_p \times d_a \times V_a} \times 100\%$$

Onde: $\%_{neral}$ = porcentagem de neral na amostra de *C. citratus*; $q_{amostra}$ = quantidade de amostra de *C. citratus* empregada na análise; d_a = densidade da amostra de *C. citratus*, em g/mL; V_a = volume de amostra empregada na análise, em mL.

Note que: $V_p = V_a$, então:

$$\%_{neral} = \frac{d_p \times T_{Neral} \times A_a}{A_p \times d_a} \times 100\%$$

- **As concentrações de geranial foram calculadas de maneira similar as concentrações de neral e a formula empregada foi:**

$$\%_{geranial} = \frac{d_p \times T_{geranial} \times A_a}{A_p \times d_a} \times 100\%$$

Onde: $\%_{geranial}$ = porcentagem de geranial na amostra de *C. citratus*; d_p = densidade do citral padrão em g/mL; $T_{geranial}$ = teor de geraniall no citral padrão; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; d_a = densidade da amostra de *C. citratus*.

EXATIDÃO MPV (Equações 7 e 8)

- ***Fator de diluição Neral (Fd_{neral}):***

- **100 mL de citral padrão→ BV 25 mL (Fd = 25);**
- **2 mL → BV 25 mL (Fd = 25 / 2 = 12,5);**
- **V_{SE} → BV 20 mL (Fd = 20 / V_{SE});**
- $Fd_{Neral} = \frac{25 \times 12{,}5 \times 20}{V_{SE}} = \frac{6250}{V_{SE}}$,

Onde: V_{SE} = volume de solução estoque de citral adicionado.

- ***Concentração de neral adicionado (teórico)***

$$[neral]_{teórica} = \frac{m_{neral}}{Fd_{neral}} = \frac{d_p \times V_p \times T_{neral}}{\frac{6250}{V_{SE}}} = \frac{d_p \times V_p \times T_{neral} \times V_{SE}}{6250},$$

Onde: d_p = densidade do citral padrão em g/mL; v_p = volume de citral padrão em mL; T_{neral} = teor de neral no citral padrão; V_{SE} = volume de solução estoque de citral adicionado.

- ***Concentração de neral encontrada (experimental)***

$$[neral]_{exp} = \frac{[neral]_p \times A_a}{A_p}, \text{ note que: } [neral]_p = \frac{d_p \times V_p \times T_{neral}}{3125}$$

$$\text{Então: } [neral]_{exp} = \frac{\frac{d_p \times V_p \times T_{neral}}{3125} \times A_a}{A_p} = \frac{d_p \times V_p \times T_{neral} \times A_a}{3125 \times A_p}$$

Onde: A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão.

- ***Recuperação do neral***

$$R_{neral} = \frac{[neral]_{exp}}{[neral]_{teórica}} \times 100\%,$$

Note que: $$R_{neral} = \frac{\left(\frac{d_p \times V_p \times T_{neral} \times A_a}{3125 \times A_p}\right)}{\left(\frac{d_p \times V_p \times T_{neral} \times V_{SE}}{6250}\right)} \times 100\%$$

Simplificando a equação temos: $$R_{neral} = \left(\frac{A_a \times 6250}{3125 \times A_p \times V_{SE}}\right) \times 100\%$$

Finalmente: $$R_{neral} = \frac{A_a \times 2}{A_p \times V_{SE}} \times 100\%$$

Onde: R_{neral} = recuperação percentual do neral; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; V_{SE} = volume de solução estoque de citral adicionado.

- **A recuperação do geranial foi calculada de maneira similar as concentrações de neral e a formula empregada foi:**

$$R_{geranial} = \frac{A_a \times 2}{A_p \times V_{SE}} \times 100\%$$

Onde: $R_{geranial}$ = recuperação percentual de geranial; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; V_{SE} = volume de solução estoque de citral adicionado.

- % de INCLUSÃO (Equação 13)

A porcentagem de inclusão é dada por:

$$\%_{inclusão} = \frac{q_{exp}}{q_{teórica}} \times 100\%$$

Onde: $\%_{inclusão}$ = porcentagem de inclusão do citral nas ciclodextrinas; q_{exp} = quantidade de citral nas micropartículas determinado por CLAE-UV; $q_{teórico}$ = quantidade teórica de citral para se ter razão de 1:1 com a ciclodextrina.

- **q_{exp} pode ser obtido pela soma do q_{neral} e $q_{geranial}$ obtidos na dedução da equação da precisão de micropartículas;**

- **$q_{teórico}$ pode ser obtido como segue:**

$$q_{teórico} = \frac{PM_{citral} \times m_{CD}}{PM_{CD}}$$

Onde: PM_{citral} = peso molecular do citral (152 g/mol); PM_{CD} = peso molecular da b-CD (1135 g/mol); m_{CD} = massa de b-CD pesada na análise das micropartículas, em mg.

- **m_{CD} pode ser obtido através da subtração da umidade presente nas micropartículas e a quantidade de citral encontrada experimentalmente. Assim tem-se:**

$$m_{CD} = m_a - (\frac{m_a \times U}{100}) - q_{neral} - q_{geranial}$$

Onde: m_a = massa de micropartículas empregada na análise por CLAE-UV, em mg; U = umidade presente nas micropartículas, em %.

PRECISÃO MICROPARTÍCULAS (Equação 14 e 15)

- **Fator de diluição do citral padrão:**
  - **80 mL (~ 70 mg) de citral padrão → BV 100 mL (Fd = 100)**
  - **5 mL → BV 25 mL (Fd = 5)**
  - **5 mL → BV 25 mL (Fd = 5)**
  - **Fd_p = 100 x 5 x 5 = 2500.**

- ***Concentração de neral na solução amostra MCDBOF***

$$[Neral]_a = \frac{[Neral]_p \times A_a}{A_p} = \frac{(\frac{m_p \times T_{Neral}}{Fd_p}) \times A_a}{A_p} = \frac{m_p \times T_{Neral} \times A_a}{Fd_p \times A_p}$$

Onde: $[Neral]_a$ = concentração de neral, em mg/mL; $[Neral]_p$ = concentração de neral padrão em mg/mL; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; T_{neral} = teor de neral no citral padrão; Fd_p = fator de diluição do padrão.

- **Fator de diluição da amostra de MCDBOF:**
  - **50 mg de micropartículas → BV 25 mL (Fd = 25)**
  - **5 mL → BV 25 mL (Fd = 5)**
  - **Fd_a = 25 x 5 = 125.**

- ***Quantidade de neral na amostra de micropartículas*:**

$$q_{Neral} = [Neral]_a \times Fd_a = \frac{m_p \times T_{Neral} \times A_a}{Fd_p \times A_p} \times Fd_a$$

Onde: q_{neral} = quantidade de neral na amostra de micropartículas, em mg; Fd_a = fator de diluição da amostra.

Substituindo os fatores de diluição, tem-se:

$$q_{Neral} = \frac{m_p \times T_{Neral} \times A_a}{2500 \times A_p} \times 125 = \frac{m_p \times T_{Neral} \times A_a}{20 \times A_p}$$

- **Porcentagem de Neral na amostra de *C. citratus*:**

$$\%_{neral} = \frac{q_{neral}}{q_{amostra}} \times 100\% = \frac{\frac{m_p \times T_{Neral} \times A_a}{20 \times A_p}}{m_a} \times 100\% = \frac{m_p \times T_{Neral} \times A_a}{20 \times A_p \times m_a} \times 100\%$$

Onde: $\%_{neral}$ = porcentagem de neral na amostra de micropartículas; $q_{amostra}$ = quantidade de amostra de *micropartículas*, em mg; m_a = massa de micropartículas, em mg.

- **As concentrações de geranial foram calculadas de maneira similar as concentrações de neral e a formula empregada foi:**

$$\%_{geranial} = \frac{m_p \times T_{Geranial} \times A_a}{20 \times A_p \times m_a} \times 100\%$$

Onde: $\%_{geranial}$ = porcentagem de geranial na amostra de micropartículas; m_p = massa de citral padrão, em mg; $T_{geranial}$ = teor de geraniall no citral padrão; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; m_a = massa de micropartículas, em mg.

EXATIDÃO MICROPARTÍCULAS (Equações 16 – 18)

- ***Fator de diluição Neral (Fd$_{neral}$):***
  - **Massa de citral padrão→ BV 100 mL (Fd = 100);**
  - **5 mL → BV 25 mL (Fd = 25 / 5 = 5);**
  - **5 mL → BV 25 mL (Fd = 25 / 5 = 5);**
  - $Fd_{Neral} = 100 \times 5 \times 5 = 2500$**,**

- ***Concentração de neral adicionado (teórico)***

$$[neral]_{teórica} = \frac{m_{neral}}{Fd_{neral}} = \frac{m_{p_x} \times T_{neral}}{2500},$$

Onde: $[neral]_{teórico}$ = concentração de neral teórica, em mg/mL; m_{neral} = massa de neral pesada, em mg; m_{px} = massa de citral padrão empregada na solução amostra, em mg; T_{neral} = teor de neral no citral padrão.

- ***Concentração de neral encontrada (experimental)***

$$[neral]_{exp} = \frac{[neral]_p \times A_a}{A_p}, \text{ note que: } [neral]_p = \frac{m_p \times T_{neral}}{2500}$$

Onde: $[neral]_{exp}$ = concentração de neral na solução amostra, em mg/mL; $[neral]_p$ = concentração de neral na solução padrão, em mg/mL; m_p = massa de citral padrão, em mg; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão.

$$\text{Então: } [neral]_{exp} = \frac{\frac{m_p \times T_{neral}}{2500} \times A_a}{A_p} = \frac{m_p \times T_{neral} \times A_a}{2500 \times A_p}$$

- ***Recuperação do neral***

$$R_{neral} = \frac{[neral]_{exp}}{[neral]_{teórica}} \times 100\%,$$

Note que: $$R_{neral} = \frac{\left(\frac{m_p \times T_{neral} \times A_a}{2500 \times A_p}\right)}{\frac{m_{p_x} \times T_{neral}}{2500}} \times 100\%$$

Simplificando a equação temos: $$R_{neral} = \frac{m_p \times A_a}{m_{px} \times A_p} \times 100\%$$

Onde: R_{neral} = recuperação percentual do neral; A_a = área do pico do neral solução amostra; A_p = área do pico do neral solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; m_{px} = massa de citral padrão empregada na solução amostra

- **A recuperação do geranial foi calculada de maneira similar as concentrações de neral e a formula empregada foi:**

$$R_{geranial} = \frac{m_p \times A_a}{m_{px} \times A_p} \times 100\%$$

Onde: $R_{geranial}$ = recuperação percentual de geranial; A_a = área do pico do geranial solução amostra; A_p = área do pico do geranial solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; m_{px} = massa de citral padrão empregada na solução amostra

- **A recuperação do citral foi calculada empregando a soma das áreas dos picos do neral e geranial:**

$$R_{citral} = \frac{m_p \times (A_{an} + A_{ag})}{m_{px} \times (A_{pn} + A_{pg})} \times 100\%$$

Onde: R_{citral} = recuperação percentual de citral; A_{an} = área do pico do neral na solução amostra; A_{ag} = área do pico do geranial na solução amostra; A_{pn} = área do pico do neral na solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; A_{pg} = área do pico do geranial solução padrão; m_p = massa de citral padrão, em mg; m_{px} = massa de citral padrão empregada na solução amostra.

ANEXO - Resultados

Linearidade MPV

RESULTADOS	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
Nível (%)	**Iso1**	**Iso2**	**Iso1**	**Iso2**	**Iso1**	**Iso2**
50	638,6	774	628,9	762,8	592	718,3
50	640	778,5	627,1	764,5	589	718,8
75	946,9	1149,7	933,6	1132,9	889,8	1080,7
75	950,7	1159,1	933,4	1139,2	888,9	1085,7
100	1240,4	1517,1	1225,6	1487,6	1191	1444,2
100	1253,3	1530	1221,2	1489,4	1221,2	1489,4
125	1581,6	1918,2	1538,5	1867,5	1478,8	1812
125	1579,6	1927,4	1529,3	1868,8	1529,3	1868,8
150	1885,4	2289,9	1849,9	2248,7	1791,2	2177,4
150	1893,4	2310,6	1844,6	2260,9	1787,6	2187,3

Médias	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
Vol (SE)	**Iso1**	**Iso2**	**Iso1**	**Iso2**	**Iso1**	**Iso2**
1,0	639,3	776,25	628	763,65	590,5	718,55
1,5	948,8	1154,4	933,5	1136,05	889,35	1083,2
2,0	1246,85	1523,55	1223,4	1488,5	1206,1	1466,8
2,5	1580,6	1922,8	1533,9	1868,15	1504,05	1840,4
3,0	1889,4	2300,25	1847,25	2254,8	1789,4	2182,35

dens padrão	0,8894
vol padrão	100
teor neral	0,476
teor geranial	0,495

RESUMO

conc	Neral	conc	Geranial
6,8	639,3	7,0	776,3
10,2	948,8	10,6	1154,4
13,5	1246,9	14,1	1523,6
16,9	1580,6	17,6	1922,8
20,3	1889,4	21,1	2300,3
6,8	628,0	7,0	763,7
10,2	933,5	10,6	1136,1
13,5	1223,4	14,1	1488,5
16,9	1533,9	17,6	1868,2
20,3	1847,3	21,1	2254,8
6,8	590,5	7,0	718,6
10,2	889,4	10,6	1083,2
13,5	1206,1	14,1	1466,8
16,9	1504,1	17,6	1840,4
20,3	1789,4	21,1	2182,4

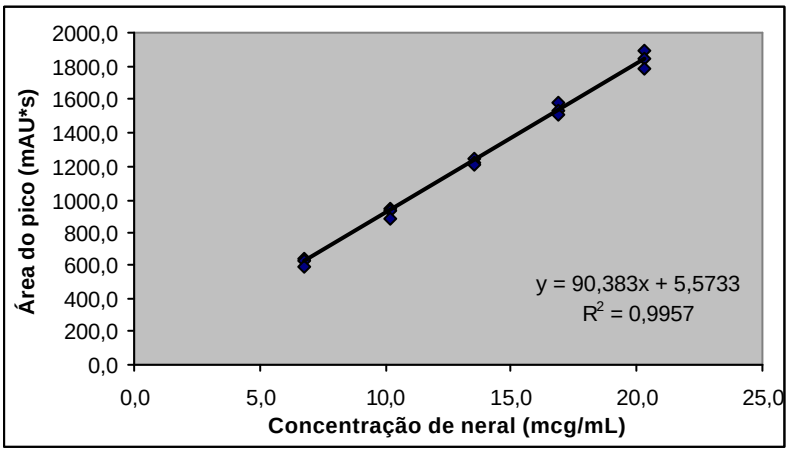
NERAL (Linearidade MPV)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9978
R-Quadrado	0,9957
R-quadrado ajustado	0,9954
Erro padrão	30,5961
Observações	15
DPR	2,50%

ANOVA

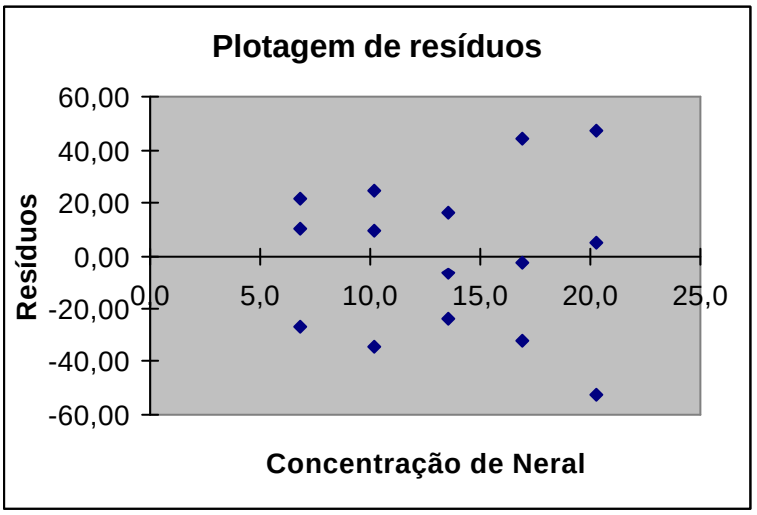
	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	2811161,2	2811161	3003,0	9,16E-17
Resíduo	13	12169,6	936,12		
Total	14	2823330,8			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*
Interseção	5,573	23,700	0,24	0,817744	-45,63	56,77
conc	90,383	1,649	54,80	9,16E-17	86,82	93,95



RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	*Previsto(a) Neral*	*Resíduos*	*Resíduos padrão*
1	617,80	21,50	0,729
2	923,91	24,89	0,844
3	1230,03	16,82	0,571
4	1536,14	44,46	1,508
5	1842,25	47,15	1,599
6	617,80	10,20	0,346
7	923,91	9,59	0,325
8	1230,03	-6,63	-0,225
9	1536,14	-2,24	-0,076
10	1842,25	5,00	0,169
11	617,80	-27,30	-0,926
12	923,91	-34,56	-1,172
13	1230,03	-23,93	-0,812
14	1536,14	-32,09	-1,088
15	1842,25	-52,85	-1,793



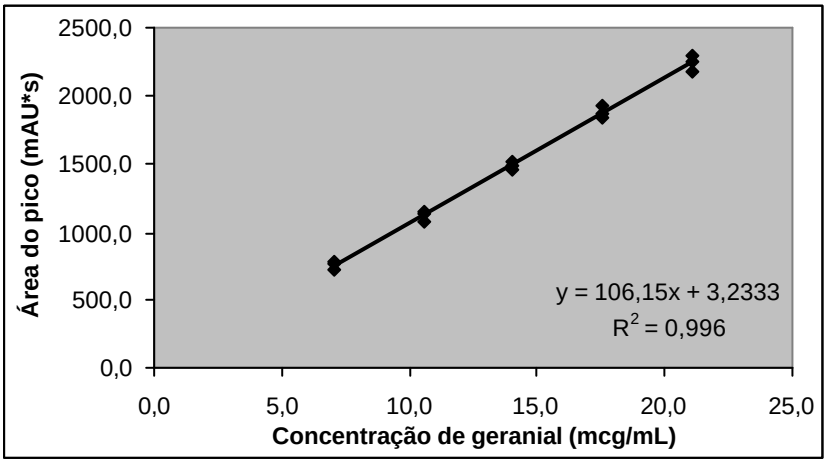
GERANIAL (Linearidade MPV)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9980
R-Quadrado	0,9960
R-quadrado ajustado	0,9957
Erro padrão	36,1343
Observações	15
DPR	2,42%

ANOVA

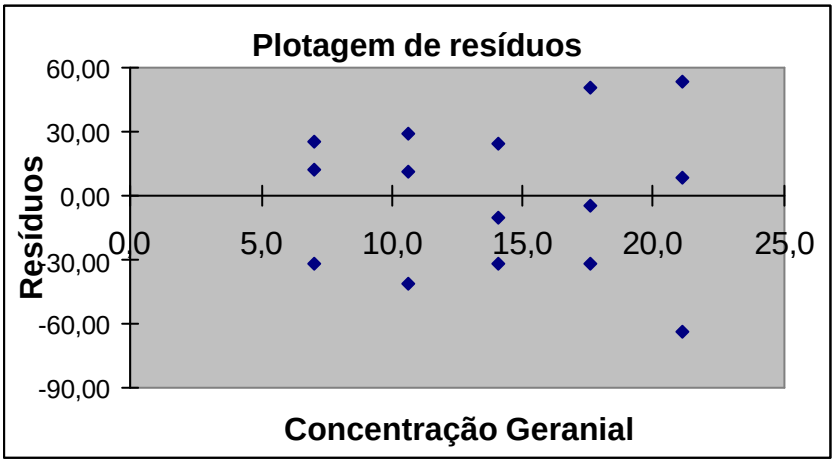
	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	4192989,445	4192989	3211,332	5,93E-17
Resíduo	13	16973,912	1305,686		
Total	14	4209963,357			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*
Interseção	3,233	27,989	0,11552	0,909799	-57,23	63,70
conc	106,147	1,873	56,66861	5,93E-17	102,10	110,19



RESULTADOS DE RESÍDUOS

Observação	*Previsto(a) Geranial*	*Resíduos*	*Resíduos padrão*
1	750,94	25,31	0,73
2	1124,79	29,61	0,85
3	1498,65	24,90	0,72
4	1872,50	50,30	1,44
5	2246,35	53,90	1,55
6	750,94	12,71	0,37
7	1124,79	11,26	0,32
8	1498,65	-10,15	-0,29
9	1872,50	-4,35	-0,12
10	2246,35	8,45	0,24
11	750,94	-32,39	-0,93
12	1124,79	-41,59	-1,19
13	1498,65	-31,85	-0,91
14	1872,50	-32,10	-0,92
15	2246,35	-64,00	-1,84



PRECISÃO MPV

	Área (injeção 1)		Área (Injeção 2)		**Média**			**%**			Analista 1
	Neral	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**	
A1	1092,4	1688,3	1094,3	1690,5	**1093,4**	**1689,4**		33,80%	44,89%	**78,7%**	
A2	1107,1	1714,9	1108,9	1718,5	**1108,0**	**1716,7**		34,25%	45,61%	**79,9%**	
A3	1095,9	1699,7	1095,4	1699,8	**1095,7**	**1699,8**		33,87%	45,16%	**79,0%**	
A4	1095,2	1698,4	1095,7	1699,4	**1095,5**	**1698,9**		33,87%	45,14%	**79,0%**	
A5	1054,8	1636,4	1055,2	1639,8	**1055,0**	**1638,1**		32,62%	43,53%	**76,1%**	
A6	1072,6	1663,9	1074,2	1665,7	**1073,4**	**1664,8**		33,18%	44,24%	**77,4%**	
A7	1097,6	1703,2	1097,4	1704,2	**1097,5**	**1703,7**		33,93%	45,27%	**79,2%**	
P1	1553,7	1880,1	1552,4	1882,9	**1553,1**	**1881,5**	**Média**	**33,65%**	**44,83%**	**78,48%**	
P2	1538,2	1860,4	1540,2	1859,5	**1539,2**	**1860,0**	**DPR**	**1,65%**	**1,60%**	**1,62%**	
	Área (injeção 1)		Área (Injeção 2)		**Média**			**%**			Analista 1
	Neral	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**	
A1	1159,5	1787,5	1173,2	1803,6	**1166,4**	**1795,6**		33,91%	45,31%	**79,2%**	
A2	1123,3	1746,6	1131	1745,4	**1127,2**	**1746,0**		32,77%	44,06%	**76,8%**	
A3	1090,6	1689,3	1091,6	1695,7	**1091,1**	**1692,5**		31,72%	42,71%	**74,4%**	
A4	1105,8	1718,4	1103	1712,7	**1104,4**	**1715,6**		32,11%	43,29%	**75,4%**	
A5	1118,5	1730	1138,7	1767,1	**1128,6**	**1748,6**		32,81%	44,13%	**76,9%**	
A6	1103,8	1712,4	1103	1713,4	**1103,4**	**1712,9**		32,08%	43,23%	**75,3%**	
A7	1145,2	1761,8	1139,4	1755,6	**1142,3**	**1758,7**		33,21%	44,38%	**77,6%**	
P1	1640,6	1988,2	1583,6	1824,6	**1612,1**	**1906,4**	**Média**	**32,66%**	**43,87%**	**76,53%**	
P2	1678,6	2032,2	1674,2	2033,8	**1676,4**	**2033,0**	**DPR**	**2,31%**	**1,98%**	**2,12%**	

	Área (injeção 1)		Área (Injeção 2)		**Média**			**%**		
	Neral	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**
A1	875,4	1350,7	875,6	1353,8	**875,5**	**1352,3**		32,27%	42,32%	**0,75**
A2	866,7	1346	870,1	1351,6	**868,4**	**1348,8**		32,01%	42,21%	**0,74**
A3	885,4	1375,3	889,2	1381,7	**887,3**	**1378,5**		32,70%	43,14%	**0,76**
A4	867,1	1346,8	871,5	1358,2	**869,3**	**1352,5**		32,04%	42,33%	**0,74**
A5	926,7	1436,8	927	1441,4	**926,9**	**1439,1**		34,16%	45,04%	**0,79**
A6	852,1	1321,4	856	1331,1	**854,1**	**1326,3**		31,48%	41,51%	**0,73**
A7	881	1368,8	881,7	1371,1	**881,4**	**1370,0**		32,48%	42,87%	**0,75**
P1	1333,3	1637,9	1334,2	1646,1	**1333,8**	**1642,0**	**Média**	**32,45%**	**42,77%**	**75,22%**
P2	1249,7	1520	1270,5	1549,1	**1260,1**	**1534,6**	**DPR**	**2,62%**	**2,63%**	**2,62%**

Analista 2

RESUMO PRECISÃO MPV

	Neral		**Geranial**		**Citral**	
Repetibilidade	**Média**	**DPR**	**Média**	**DPR**	**Média**	**DPR**
Analista 1 (Dia 1)*	32,45%	2,62%	42,77%	2,63%	78,48%	1,62%
Analista 2 (Dia 2)*	33,65%	1,65%	44,83%	1,60%	76,53%	2,12%
Analista 2 (Dia 3)*	32,66%	2,31%	43,87%	1,98%	75,22%	2,62%
Precisão Intermediária	32,92%	**2,66%**	43,83%	**2,80%**	76,74%	**2,71%**

*** n=7**

Comparação CLAE - CG

	Neral	Geranial
Média CLAE	32,92%	43,83%
CG	33,5%	44,6%
n	21	21
t (0,05; 20)	2,085	
Desvio Padrão	0,9%	1,2%
t calc	-1,464335	-1,38514
	0,158	**0,181**

Exatidão MPV

	Área Pico (Inj 1)		Área Pico (Inj 2)		Neral				Geranial			
Nível	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Área Média**	**Exatidão**	**Média**	**DPR**	**Área Média**	**Exatidão**	**Média**	**DPR**
50A	809,4	980,3	808,8	980,7	809,1	103,3%			980,5	103,1%		
50B	777,0	942,6	775,3	944,2	776,2	99,1%	**99,4%**	**3,8%**	943,4	99,2%	**99,4%**	**3,6%**
50C	749,9	910,0	750,9	916,9	750,4	95,9%			913,5	96,0%		
75A	1210,6	1466,8	1209,7	1471,8	1210,2	103,1%			1469,3	103,0%		
75C	1154,3	1401,3	1154,0	1405,5	1154,2	98,3%	**100,0%**	**2,7%**	1403,4	98,4%	**100,0%**	**2,6%**
75B	1159,7	1407,5	1157,1	1408,2	1158,4	98,6%			1407,9	98,7%		
100A	1572,0	1907,7	1569,4	1911,7	1570,7	100,3%			1909,7	100,4%		
100B	1545,1	1875,8	1537,7	1877,6	1541,4	98,4%	**98,7%**	**1,5%**	1876,7	98,7%	**98,9%**	**1,5%**
100C	1527,4	1855,0	1521,3	1855,7	1524,4	97,4%			1855,4	97,5%		
125A	1955,3	2379,2	1949,0	2381,9	1952,2	99,7%			2380,6	100,1%		
125B	1912,0	2329,8	1920,4	2343,7	1916,2	97,9%	**98,6%**	**1,0%**	2336,8	98,3%	**98,9%**	**1,1%**
125C	1923,9	2339,0	1914,5	2337,8	1919,2	98,1%			2338,4	98,4%		
150B	2290,7	2786,7	2281,1	2790,1	2285,9	97,3%			2788,4	97,7%		
150C	2255,4	2764,9	2258,9	2756,5	2257,2	96,1%	**96,9%**	**0,7%**	2760,7	96,8%	**97,4%**	**0,6%**
150A	2276,5	2773,3	2294,2	2809,2	2285,4	97,3%			2791,3	97,8%		
P1	1562,7	1896,4	1583,6	1919,8	1565,8	**Total**	**98,7%**	**2,2%**	1902,1	**Total**	**98,9%**	**2,0%**
P2	1559,8	1895,6	1556,9	1896,6								

Robustez MPV

	Área Pico			Área Pico		%	
Exp	**Neral**	**Geranial**		**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**
A1	1225,7	1906,6	**P1**	1803,6	2211,1	**0,3248**	**0,4286**
A2	1212,9	1847,2	**P2**	1789,2	2138,1	**0,3240**	**0,4294**
A3	1222,3	1862,0	**P3**	1793,1	2155,0	**0,3258**	**0,4295**
A4	1115,8	1692,0	**P4**	1641,2	1955,6	**0,3250**	**0,4301**
A5	1110,3	1735,2	**P5**	1638,9	2008,7	**0,3238**	**0,4294**
A6	1120,9	1744,6	**P6**	1652,4	2021,5	**0,3242**	**0,4290**
A7	1234,6	1922,0	**P7**	1814,5	2231,6	**0,3252**	**0,4281**
A8	1125,3	1717,8	**P8**	1648,8	1993,0	**0,3262**	**0,4284**
A9	1133,7	1768,8	**P9**	1666,1	2055,6	**0,3252**	**0,4277**
A10	1200,4	1891,7	**P10**	1786,6	2194,2	**0,3211**	**0,4285**
A11	1133,5	1732,4	**P11**	1665,8	2009,4	**0,3252**	**0,4285**
A12	1212,1	1841,9	**P12**	1784,4	2133,6	**0,3247**	**0,4291**
					Média	**32,46%**	**42,89%**
					Desvio	0,13%	0,07%
					DPR	0,40%	0,16%

Resultados

Exp nº	Coluna	D1	FO	Temp	D2	D3	D4	pH	Fluxo	Comp	D5
1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
3	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
10	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
11	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

GERANIAL

Efeito (+)	42,85%	42,88%	42,89%	42,90%	42,90%	42,91%	42,90%	42,90%	42,89%	42,86%	42,87%
Efeito (-)	42,93%	42,89%	42,89%	42,87%	42,87%	42,87%	42,88%	42,87%	42,89%	42,92%	42,91%
Efeito	**-0,08%**	**-0,01%**	**0,00%**	**0,03%**	**0,03%**	**0,04%**	**0,02%**	**0,03%**	**0,00%**	**-0,06%**	**-0,04%**
Razão	-0,18%	-0,03%	-0,01%	0,08%	0,07%	0,09%	0,05%	0,06%	-0,01%	-0,15%	-0,09%

NERAL

Efeito (+)	32,54%	32,44%	32,42%	32,44%	32,47%	32,48%	32,49%	32,45%	32,50%	32,41%	32,44%
Efeito (-)	32,38%	32,48%	32,50%	32,49%	32,46%	32,44%	32,43%	32,47%	32,43%	32,52%	32,49%
Efeito	**0,16%**	**-0,04%**	**-0,08%**	**-0,05%**	**0,01%**	**0,04%**	**0,06%**	**-0,02%**	**0,07%**	**-0,11%**	**-0,05%**
Razão	0,50%	-0,13%	-0,25%	-0,15%	0,04%	0,13%	0,19%	-0,05%	0,20%	-0,33%	-0,17%

Adequabilidade do sistema

	Tailing		N		K		Resolução
	Neral	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral - Geranial**
A1	1,180	1,184	20746,0	20643,5	2,849	3,159	2,570
A2	1,163	1,164	20413,0	20321,5	3,448	3,836	2,787
A3	1,168	1,170	20556,5	20523,0	2,784	3,085	2,555
A4	1,170	1,175	20462,0	20310,5	3,459	3,848	2,774
A5	1,175	1,181	21025,5	20763,5	2,741	3,025	2,472
A6	1,168	1,171	20764,0	20626,5	3,615	4,037	2,931
A7	1,167	1,155	19198,0	19274,0	3,645	4,013	2,516
A8	1,202	1,187	17866,5	17874,5	3,295	3,606	2,199
A9	1,179	1,166	18140,5	18116,5	4,055	4,496	2,658
A10	1,181	1,170	17667,0	17612,0	4,130	4,577	2,620
A11	1,203	1,192	17390,0	17332,0	3,344	3,673	2,248
A12	1,214	1,197	17073,5	17037,5	3,190	3,497	2,164
média	1,180	1,176	19275,2	19202,9	3,380	3,738	2,541
DP	0,01667	0,0124	1539	1490,2	0,45172	0,5058	0,2409
DPR	1,4%	1,1%	8,0%	7,8%	13,4%	13,5%	9,5%

Extremo	**1,214**	**1,197**	**17074**	**17038**	**2,74**	**3,02**	**2,164**

Precisão - Micropartículas

	Área (injeção 1)		Área (Injeção 2)		Média				%				
	Neral	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**		
A1	783,1	1670,2	790,1	1705,2	**786,6**	**1687,7**	**50,0**		2,28%	4,19%	**6,5%**	**Analista 1**	
A2	811,4	1783,3	821,6	1761,8	**816,5**	**1772,6**	**51,5**		2,30%	4,27%	**6,6%**		
A3	893,5	1922,4	900,4	1935,7	**897,0**	**1929,1**	**55,8**		2,33%	4,29%	**6,6%**		
A4	882,7	1910,1	905	1950,7	**893,9**	**1930,4**	**57,2**		2,26%	4,19%	**6,5%**		
A5	881,6	1894,6	889,2	1914,5	**885,4**	**1904,6**	**55,8**		2,30%	4,23%	**6,5%**		
A6	842,6	1818,1	850,1	1823,8	**846,4**	**1821,0**	**54,1**		2,27%	4,18%	**6,4%**	Tneral	0,4760
P1	1183,2	1442,9	1196,4	1445,6	**1189,8**	**1444,3**	**72,4**	**Média**	**2,29%**	**4,22%**	**6,51%**	Tgeranial	0,4950
								DPR	**1,07%**	**1,13%**	**1,09%**		
	Área (injeção 1)		Área (Injeção 2)		Média				%			**Analista 2**	
	Neral	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**		
A1	787,7	1700,1	786,3	1710,6	**787,0**	**1705,4**	**50,1**		2,21%	4,15%	**6,36%**		
A2	810,9	1750	815,3	1758,9	**813,1**	**1754,5**	**51,1**		2,24%	4,18%	**6,42%**		
A3	818,2	1766,2	822,2	1775,4	**820,2**	**1770,8**	**52,0**		2,22%	4,15%	**6,37%**		
A4	782,2	1692,5	789,9	1693,8	**786,1**	**1693,2**	**50,1**		2,21%	4,12%	**6,33%**		
A5	816,6	1760,3	819,9	1782,8	**818,3**	**1771,6**	**51,5**		2,24%	4,19%	**6,43%**		
A6	837,3	1804,7	850,2	1815,4	**843,8**	**1810,1**	**52,3**		2,27%	4,22%	**6,49%**		
P1	1242,6	1493,9	1245	1497,4	**1243,8**	**1495,7**	**73,6**	**Média**	**2,23%**	**4,17%**	**6,40%**		
								DPR	**1,04%**	**0,86%**	**0,91%**		

Analista 1

	Área (injeção 1)		Área (Injeção 2)		Média				%		
	Neral	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Neral**	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**
A1	803,4	1727,8	807,5	1735,6	**805,5**	**1731,7**	**50,5**		2,29%	4,24%	**6,5%**
A2	795,7	1710,4	794,2	1715,4	**795,0**	**1712,9**	**50,0**		2,29%	4,24%	**6,5%**
A3	829,3	1789,4	825,7	1785,3	**827,5**	**1787,4**	**51,2**		2,32%	4,32%	**6,6%**
A4	811,8	1757,8	814,7	1766,1	**813,3**	**1762,0**	**50,1**		2,33%	4,35%	**6,7%**
A5	795,4	1710,7	798,9	1712,4	**797,2**	**1711,6**	**49,9**		2,30%	4,24%	**6,5%**
A6	792,1	1720,2	797,3	1728,5	**794,7**	**1724,4**	**50,4**		2,27%	4,23%	**6,5%**
P1	1199,9	1452,6	1203,4	1453,7	**1201,7**	**1453,2**	**72,6**	**Média**	**2,30%**	**4,27%**	**6,57%**
								DPR	**1,07%**	**1,18%**	**1,13%**

	Neral		**Geranial**		**Citral**	
Repetibilidade	**Média**	**DPR**	**Média**	**DPR**	**Média**	**DPR**
Analista 1 (Dia 1)*	2,29%	1,07%	4,22%	1,13%	6,51%	1,09%
Analista 2 (Dia 2)*	2,23%	1,04%	4,17%	0,86%	6,40%	0,91%
Analista 2 (Dia 3)*	2,30%	1,07%	4,27%	1,18%	6,57%	1,13%
Precisão Intermediária	**2,27%**	**1,67%**	**4,22%**	**1,44%**	6,49%	1,50%

Exatidão - Micropartículas

Área do pico					Neral			Geranial			Citral		
Nível (rep)	**Neral**	**Geranial**	**mp (mg)**		**Recup**		**DPR**	**Recup**		**DPR**	**Recup**		**DPR**
50a	692,0	831,5	41,4		102,2%			102,2%			102,2%		
50b	718,2	863,9	42,9		102,4%	101,2%	1,9%	102,4%	101,2%	2,0%	102,4%	101,2%	2,0%
50c	654,9	787,2	40,5		98,9%			98,9%			98,9%		
100a	1066,0	1281,6	65,1		100,1%			100,1%			100,1%		
100b	1121,1	1348,2	69,2		99,1%	100,0%	0,9%	99,1%	100,0%	0,9%	99,1%	100,0%	0,9%
100c	1125,2	1351,4	68,2		100,9%			100,8%			100,8%		
150a	1657,3	1988,0	101,0		100,3%			100,1%			100,2%		
150b	1728,9	2084,2	104,0		101,7%	100,7%	0,9%	101,9%	100,7%	1,0%	101,8%	100,7%	1,0%
150c	1724,1	2076,7	105,5		99,9%			100,1%			100,0%		
Padrão	1170,8	1407,5	71,6	**Média**	**100,6%**		**1,3%**	**100,6%**		**1,3%**	**100,6%**		**1,3%**

Precisão - Creme

	Área (injeção 1)				%			Analista 1	
	Neral	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**		
A1	916,2	1406,6	**495,7**		0,267%	0,358%	**0,625%**		
A2	987,0	1525,0	**520,8**		0,274%	0,369%	**0,643%**		
A3	982,6	1517,9	**514,5**		0,276%	0,372%	**0,648%**		
A4	946,5	1456,9	**501,2**		0,273%	0,366%	**0,639%**		
A5	949,0	1463,2	**501,5**		0,273%	0,368%	**0,641%**		
A6	947,1	1459,3	**512,6**		0,267%	0,359%	**0,626%**	Tneral	0,4760
P1	1211,2	1443,2	**73,5**	**Média**	**0,272%**	**0,365%**	**0,637%**	Tgeranial	0,4950
				DPR	**1,39%**	**1,57%**	**1,49%**		

	Media de 2 injeções				%			Analista 2
	Neral	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**	
A1	914,9	1403,8	**501,0**		0,264%	0,352%	**0,615%**	
A2	953,7	1462,6	**516,5**		0,267%	0,355%	**0,622%**	
A3	981,8	1515,7	**521,2**		0,272%	0,365%	**0,637%**	
A4	943,3	1451,7	**509,1**		0,268%	0,358%	**0,625%**	
A5	947,6	1461,2	**508,2**		0,269%	0,361%	**0,630%**	
A6	920,5	1413,5	**502,4**		0,265%	0,353%	**0,617%**	
P1	1239,7	1483,6	**75,2**	**Média**	**0,267%**	**0,357%**	**0,624%**	
				DPR	**1,15%**	**1,40%**	**1,29%**	

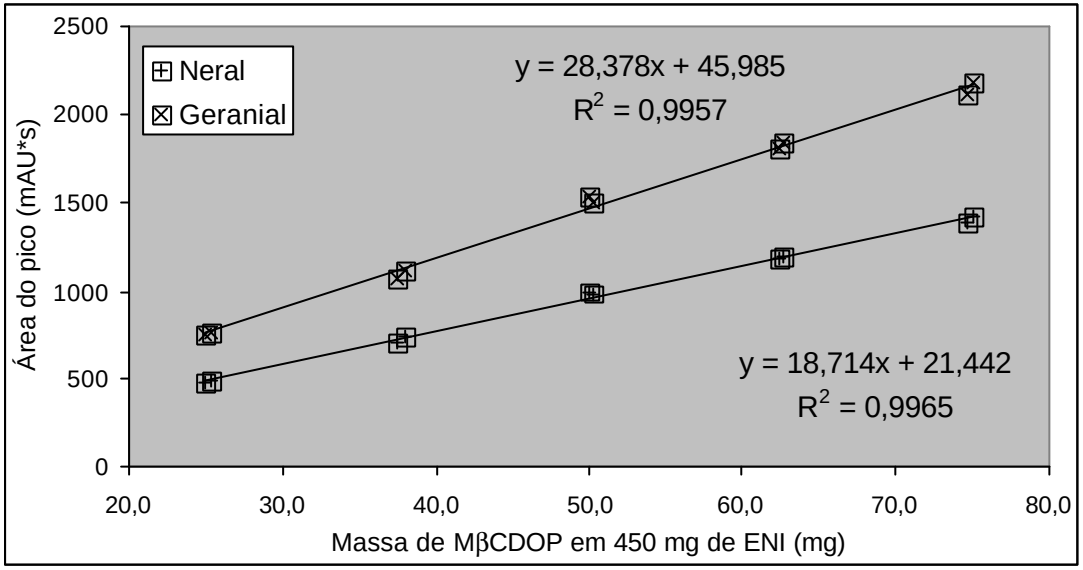
Vanessa
14 mar

	Média de 2 injeções				%		
	Neral	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**
A1	958,0	1472,7	**509,6**		0,271%	0,363%	**0,634%**
A2	934,5	1439,0	**504,1**		0,268%	0,358%	**0,626%**
A3	950,5	1462,9	**518,0**		0,265%	0,354%	**0,619%**
A4	950,1	1452,0	**498,5**		0,275%	0,365%	**0,641%**
A5	937,4	1443,8	**502,0**		0,270%	0,361%	**0,630%**
A6	989,1	1512,0	**517,8**		0,276%	0,366%	**0,642%**
P1	1156,0	1384,1	**70,4**	**Média**	**0,271%**	**0,361%**	**0,632%**
				DPR	**1,57%**	**1,26%**	**1,39%**

Exatidão - Creme

Área do pico*					Neral			Geranial			Citral		
Nível (rep)	**Neral**	**Geranial**	**mp (mg)**		**Recup**	**Média**	**DPR**	**Recup**	**Média**	**DPR**	**Recup**	**Média**	**DPR**
50a	487,2	756,4	25,3		98,8%	98,5%	0,4%	100,2%	99,8%	0,5%	99,6%	99,3%	0,5%
50b	478,4	742,1	25,0		98,2%			99,5%			99,0%		
75a	730,5	1116,8	37,9		98,9%	97,6%	1,9%	98,8%	97,4%	2,0%	98,8%	97,5%	2,0%
75b	704,0	1073,8	37,5		96,3%			96,0%			96,1%		
100a	987,8	1504,2	50,3		100,7%	101,6%	1,2%	100,2%	101,6%	1,8%	100,4%	101,6%	1,6%
100b	1000,2	1537,9	50,1		102,4%			102,9%			102,7%		
125a	1203,2	1838,7	62,7		98,4%	97,8%	0,9%	98,3%	97,8%	0,7%	98,3%	97,8%	0,8%
125b	1182,5	1811,0	62,4		97,2%			97,3%			97,2%		
150a	1391,5	2111,4	74,7		95,6%	96,4%	1,3%	94,7%	96,1%	2,1%	95,1%	96,3%	1,8%
150b	1422,9	2182,3	75,0		97,3%			97,5%			97,4%		
Padrão	972,8	1488,8	49,9	**Média**		**98,4%**	**2,1%**		**98,5%**	**2,4%**		**98,5%**	**2,2%**

*Média de duas determinações



Precisão - Gel

	Área (injeção 1)				%			Analista 1	
	Neral	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**		
A1	877,9	1369,7	**481,0**		0,264%	0,359%	**0,623%**		
A2	913,8	1426,0	**505,4**		0,261%	0,356%	**0,617%**		
A3	907,4	1416,5	**500,8**		0,262%	0,357%	**0,618%**		
A4	937,4	1459,6	**507,0**		0,267%	0,363%	**0,630%**		
A5	900,5	1402,3	**495,7**		0,262%	0,357%	**0,619%**		
A6	923,5	1440,0	**506,4**		0,263%	0,358%	**0,622%**	Tneral	0,4760
P1	1211,2	1443,2	**73,5**	**Média**	**0,263%**	**0,358%**	**0,621%**	Tgeranial	0,4950
				DPR	**0,80%**	**0,73%**	**0,76%**		

	Media de 2 injeções				%			Analista 2
	Neral	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**	
A1	951,3	1490,9	**509,2**		0,270%	0,367%	**0,637%**	
A2	942,1	1475,3	**512,3**		0,265%	0,361%	**0,627%**	
A3	905,7	1414,7	**498,7**		0,262%	0,356%	**0,618%**	
A4	903,0	1414,2	**500,4**		0,261%	0,355%	**0,615%**	
A5	920,5	1439,2	**500,8**		0,265%	0,361%	**0,626%**	
A6	909,0	1421,8	**501,7**		0,262%	0,356%	**0,617%**	
P1	1239,7	1483,6	**75,2**	**Média**	**0,264%**	**0,359%**	**0,623%**	
				DPR	**1,29%**	**1,35%**	**1,32%**	

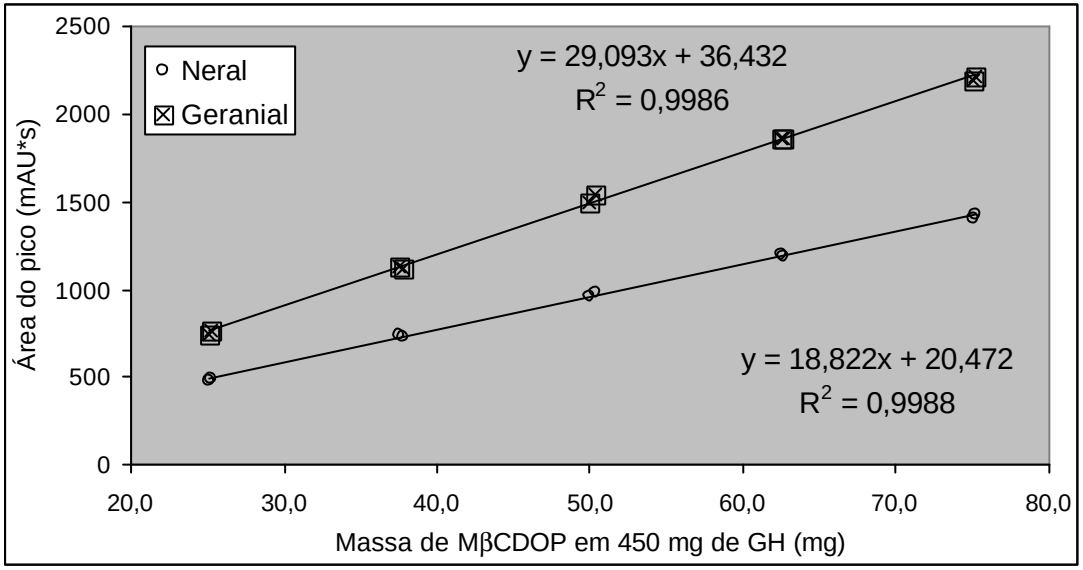
	Média de 2 injeções				%			Analista 1
	Neral	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**	
A1	952,0	1475,6	**501,4**		0,274%	0,369%	**0,643%**	
A2	932,5	1450,0	**498,3**		0,270%	0,365%	**0,635%**	
A3	948,6	1479,8	**511,4**		0,268%	0,363%	**0,631%**	
A4	955,2	1488,2	**520,3**		0,265%	0,359%	**0,624%**	
A5	935,8	1449,5	**503,2**		0,268%	0,361%	**0,630%**	
A6	974,1	1521,5	**508,2**		0,277%	0,376%	**0,652%**	
P1	1156,0	1384,1	**70,4**	**Média**	**0,270%**	**0,366%**	**0,636%**	
				DPR	**1,59%**	**1,66%**	**1,62%**	

	Neral		**Geranial**		**Citral**	
Repetibilidade	**Média**	**DPR**	**Média**	**DPR**	**Média**	**DPR**
Analista 1 (Dia 1)*	0,263%	0,80%	0,358%	0,73%	0,621%	0,76%
Analista 2 (Dia 2)*	0,264%	1,29%	0,359%	1,35%	0,623%	1,32%
Analista 1 (Dia 3)	0,270%	1,59%	0,366%	1,66%	0,636%	1,62%
Precisão Intermediária	0,266%	**1,72%**	0,361%	**1,54%**	0,627%	**1,61%**

Exatidão - Gel

	Área do pico*				Neral			Geranial			Citral		
Nível (rep)	Neral	Geranial	mp (mg)		Recup	Média	DPR	Recup	Média	DPR	Recup	Média	DPR
50a	478,1	743,3	25,1		97,2%	98,3%	1,6%	97,4%	98,4%	1,3%	97,3%	98,3%	1,4%
50b	491,0	760,5	25,2		99,4%			99,3%			99,3%		
75a	733,2	1140,5	37,5		99,7%	99,0%	1,0%	100,1%	99,2%	1,3%	99,9%	99,1%	1,2%
75b	728,4	1129,4	37,8		98,3%			98,3%			98,3%		
100a	968,4	1499,1	50,0		98,8%	99,6%	1,2%	98,7%	99,7%	1,5%	98,7%	99,7%	1,3%
100b	992,6	1542,5	50,4		100,5%			100,7%			100,6%		
125a	1195,4	1861,2	62,6		97,4%	97,8%	0,6%	97,8%	98,1%	0,3%	97,7%	98,0%	0,4%
125b	1204,3	1866,7	62,5		98,3%			98,3%			98,3%		
150a	1412,0	2188,2	75,0		96,0%	96,7%	1,0%	96,0%	96,5%	0,7%	96,0%	96,6%	0,9%
150b	1436,8	2217,0	75,2		97,5%			97,0%			97,2%		
Padrão	980,3	1519,5	50,0	**Média**		**98,3%**	**1,4%**		**98,4%**	**1,4%**		**98,3%**	**1,4%**

*Média de duas determinações



Estabilidade das Formulações contendo micropartículas com óleo de C. citratus(Creme e Gel)

Formulações

31/mar	Área (injeção 1)		Área (injeção 2)		**Média**				**%**		
t = 0	Neral	geranial	Neral	geranial	**Neral**	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**
Creme Filt (40 ºC)	1097,2	2444,5	1100,2	2446,9	**1098,7**	**2445,7**	**502,5**		0,308%	0,581%	**0,889%**
Creme spray (40ºC)	1191,8	2288,2	1193,6	2290,1	**1192,7**	**2289,2**	**505,8**		0,332%	0,540%	**0,872%**
Gel Filt (40 ºC)	1129,7	2477,4	1128,1	2478,8	**1128,9**	**2478,1**	**507,4**		0,313%	0,583%	**0,896%**
Gel Spray (40 ºC)	1282,5	2395,4	1283,2	2396,9	**1282,9**	**2396,2**	**517,2**		0,349%	0,553%	**0,902%**
Padrão	1240,9	1523,0	1249,4	1533,7	**1245,2**	**1528,4**	**73,7**	**Média**	**0,326%**	**0,564%**	**0,890%**
								DPR	**5,79%**	**3,74%**	**1,46%**

18/jul	Área (injeção 1)		Área (injeção 2)		Média				%		
t = 110	Neral	geranial	Neral	geranial	**Neral**	**Geranial**	**Peso (mg)**		**Neral**	**Geranial**	**Citral**
Creme Filt (40 ºC)	825,2	2045,3	828,4	2053,1	**826,8**	**2049,2**	**506,0**		0,244%	0,527%	**0,771%**
Creme spray (40ºC)	756,7	1609,8	766,4	1629,2	**761,55**	**1619,5**	**514,9**		0,220%	0,409%	**0,630%**
Gel Filt (40 ºC)	810,8	2273,6	813,5	2279,9	**812,15**	**2276,75**	**527,2**		0,230%	0,562%	**0,792%**
Gel Spray (40 ºC)	886	2462,1	889,9	2475	**887,95**	**2468,55**	**526,5**		0,251%	0,610%	**0,861%**
Padrão	913	1086,4	919,8	1097,2	**916,4**	**1091,8**	**57,4**	**Média**	**0,236%**	**0,527%**	**0,763%**
								DPR	**5,86%**	**16,24%**	**12,73%**

Tneral	0,476
Tgeranial	0,495

RESUMO - Estabilidade Formulações 40 ºC

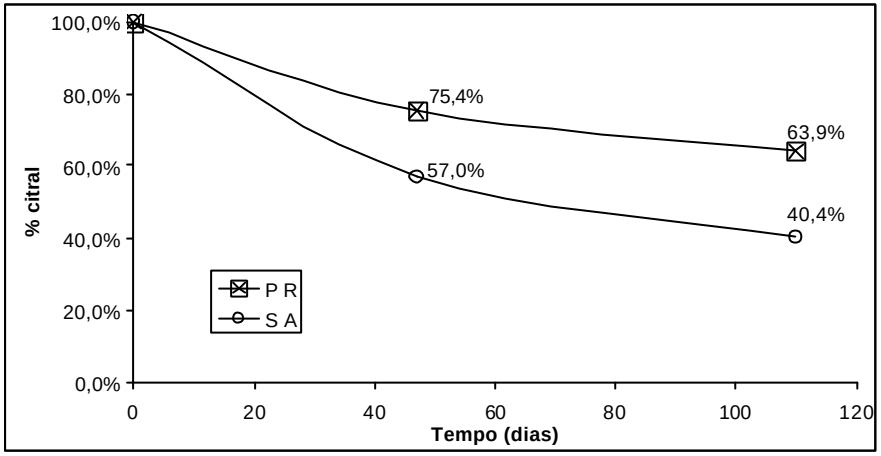
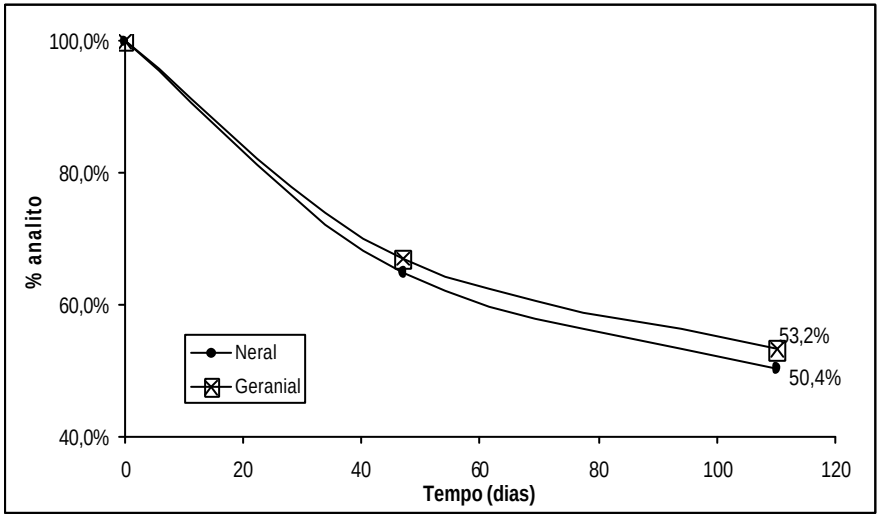
	neral			**geranial**			**citral**		
	t = 0	**t = 110**	%	**t = 0**	**t = 110**	**%**	**t = 0**	**t = 110**	%
Creme Filt (40 ºC)	**0,308%**	**0,244%**	79,1%	**0,581%**	**0,527%**	90,7%	**0,889%**	**0,771%**	**86,7%**
Creme spray (40ºC)	**0,332%**	**0,220%**	66,4%	**0,540%**	**0,409%**	75,8%	0,872%	**0,630%**	**72,2%**
Gel Filt (40 ºC)	**0,313%**	**0,230%**	73,3%	**0,583%**	**0,562%**	96,4%	0,896%	0,792%	**88,3%**
Gel Spray (40 ºC)	**0,349%**	**0,251%**	72,0%	**0,553%**	0,610%	110,3%	0,902%	**0,861%**	**95,5%**
Média			**72,7%**			**93,3%**			**85,7%**
Creme	**0,320%**	**0,232%**	**72,7%**	**0,561%**	**0,468%**	**83,2%**	**0,881%**	**0,700%**	**79,4%**
Gel	**0,331%**	**0,241%**	**72,6%**	**0,568%**	**0,586%**	**103,4%**	**0,899%**	**0,827%**	**91,9%**
Filtrado	0,311%	0,237%	**76,2%**	0,582%	0,544%	**93,6%**	0,893%	0,781%	**87,5%**
Spray	0,341%	0,236%	**69,2%**	0,547%	0,510%	**93,1%**	0,887%	0,746%	**83,8%**

Estabilidade Micropartículas contendo óleo de C. citratus

	Área (injeção 1)		Área (injeção 2)			Média		%		
31/mar	Neral	geranial	Neral	geranial	**Neral**	**Geranial**	**Peso (mg)**	**Neral**	**Geranial**	**Citral**
Pó Filt a	900,9	1847,6	904,7	1850,8	**902,8**	**1829,1**	**50,8**	**2,50%**	**4,30%**	**6,80%**
Pó Filt b	934,0	1921,9	942,6	1929,2	**938,3**	**1925,6**	**52,6**	**2,51%**	**4,37%**	**6,88%**
PóSpray a	963,0	1807,4	956,1	1802,1	**959,6**	**1804,8**	**51,1**	**2,65%**	**4,22%**	**6,86%**
Pó spray b	943,4	1771,4	939,9	1771,8	**941,7**	**1771,6**	**50,7**	**2,62%**	**4,17%**	**6,79%**
Padrão	1240,9	1523,0	1249,4	1533,7	**1245,2**	**1528,4**	**73,7**			
17/mai										
Pó Filt (40 ºC) a	625,0	1302,5	625,5	1304,2	**625,3**	**1303,4**	**47,3**	**1,89%**	**3,39%**	**5,28%**
Pó Filt (40 ºC) b	595,0	1238,0	596,4	1238,3	**595,7**	**1238,2**	**47,2**	**1,81%**	**3,22%**	**5,03%**
Pó spray (40 ºC) a	486,1	911,4	487,0	913,0	**486,6**	**912,2**	**47,3**	**1,47%**	**2,37%**	**3,84%**
Pó spray (40 ºC) b	489,8	917,2	489,5	917,5	**489,7**	**917,4**	**46,5**	**1,51%**	**2,42%**	**3,93%**
Padrão	980,9	1188,0			**980,9**	**1188,0**	**59,0**			
18/jun										
Pó Filt (40 ºC)	520,3	1106,6	521,1	1108,6	**520,7**	**1107,6**	**50,7**	**1,53%**	**2,84%**	**4,37%**
Pó spray (40 ºC)	359,1	659,6	358,7	660,1	**358,9**	**659,9**	**50,6**	**1,06%**	**1,70%**	**2,75%**
Padrão	913,0	1086,4	919,8	1097,2	**916,4**	**1091,8**	**57,4**			

RESUMO - Estabilidade Pó (40 ºC)

	Neral			Geranial			Citral		
Tempo (dias)	**0**	**47**	**110**	**0**	**47**	**110**	**0**	**47**	**110**
Filtrado	2,508%	1,850%	1,53%	4,333%	3,306%	2,84%	6,841%	5,155%	4,37%
	100,0%	73,7%	61,0%	100,0%	76,3%	65,6%	100,0%	75,4%	63,9%
Spray	2,631%	1,490%	1,06%	4,193%	2,398%	1,70%	6,824%	3,888%	2,75%
	100,0%	56,6%	40,2%	100,0%	57,2%	40,5%	100,0%	57,0%	40,4%
Média	2,570%	1,670%	1,294%	4,263%	2,852%	2,270%	6,833%	4,521%	3,564%
%	100,0%	65,0%	50,4%	100,0%	66,9%	53,2%	100,0%	66,2%	52,1%

Citral	**0**	**47**	**110**
P R	100,0%	75,4%	63,9%
S A	100,0%	57,0%	40,4%

EstabilidadeMicropartículas